



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EL ANTIBIÓTICO ANISOMICINA INDUCE LA
DEGRADACIÓN DE LAS ONCOPROTEÍNAS SNON Y
SKI EN CÉLULAS DE MELANOMA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

RÍOS LÓPEZ DIANA GRISEL



**DIRECTOR DE TESIS:
Dra. Marina Macías Silva
(2013)**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
Secretaría General
División de Estudios Profesionales

Votos Aprobatorios

DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ
Director General
Dirección General de Administración Escolar
Presente

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

El antibiótico anisomicina induce la degradación de las oncoproteínas SnoN y Ski en células de melanoma

realizado por **Ríos López Diana Grisela** con número de cuenta **3-0532593-4** quien ha decidido titularse mediante la opción de tesis en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario Dra. Laura Kawasaki Watanabe

Propietario Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo

Propietario Dra. Marina Macías Silva
Tutora

Suplente LIBB. Genaro Vázquez Victorio

Suplente Dr. Ernesto Soto Reyes Solís

Atentamente

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU ”
Ciudad Universitaria, D. F., a 30 de octubre de 2012
EL JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

MAG/mdm

1. Datos del alumno	1. Datos del alumno
Apellido paterno	Ríos
Apellido materno	López
Nombre (s)	Diana Grisel
Teléfono	58653448
Universidad Nacional Autónoma de México	Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias	Facultad de Ciencias
Carrera	Biología
Número de cuenta	305325934
2. Datos del Tutor	2. Datos del tutor
Nombre (s)	Marina
Apellido paterno	Macías
Apellido materno	Silva
3. Datos del Sinodal 1	3. Datos del sinodal 1
Nombre (s)	Laura
Apellido paterno	Kawasaki
Apellido materno	Watanabe
4. Datos del Sinodal 2	4. Datos del sinodal 2
Nombre (s)	Luis Alonso
Apellido paterno	Herrera
Apellido materno	Montalvo
5. Datos del Sinodal 3	5. Datos del sinodal 3
Nombre (s)	Marina
Apellido paterno	Macías
Apellido materno	Silva
6. Datos del Sinodal 4	6. Datos del sinodal 4
Nombre (s)	Genaro
Apellido paterno	Vázquez
Apellido materno	Victorio
7. Datos del Sinodal 5	7. Datos del sinodal 5
Nombre (S)	Ernesto
Apellido Paterno	Soto-Reyes
Apellido Materno	Solís
8. Datos del trabajo escrito	8. Datos del trabajo escrito
Título	El antibiótico anisomicina induce la degradación de las oncoproteínas SnoN y Ski en células de melanoma
Número de páginas	57 pp
Año	2013

El presente trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Marina Macías Silva en el laboratorio 225 Norte del Departamento de Biología Celular y del Desarrollo, en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El proyecto fue apoyado por los donativos de PAPIIT/DGAPA/UNAM No. IN206012 y CONACYT No. 101826. Así mismo, como parte del donativo PAPIIT/DGAPA/UNAM No. IN206012, la alumna Diana Grisel Ríos López recibió una beca de conclusión de estudios de licenciatura.

AGRADECIMIENTOS

En la vida podemos optar por diferentes caminos; sin embargo, las oportunidades son valiosas y significativas, por lo que mi más sincero agradecimiento para la Dra. Marina Macías Silva por permitirme integrar a su equipo de trabajo y aprender de su línea de investigación. Por sus enseñanzas, gracias.

Porque el individualismo no es una opción para vivir si contamos con la maravillosa capacidad para interactuar con otros seres y retroalimentar nuestro conocimiento, por ello agradezco a todos mis compañeros del Laboratorio 225 norte; en especial a Jacqueline Hernández por permitirme ser parte de su proyecto, gracias por tu apoyo, compañerismo y enseñanzas; a mis colegas Genaro Vázquez, Cassandre Caligaris, Eugenio Del Valle, Nelly González, Aura Campero y Angeles Tecalco, gracias a todos ustedes por su compañerismo, por compartir su experiencia y conocimientos conmigo, sus atentas explicaciones y consejos, fue una maravillosa y grata experiencia pasar tiempo con todos ustedes.

También agradezco a Marcela Sosa Garrocho por su apoyo técnico en todas mis locuras experimentales, por su paciencia, compañerismo y enseñanza.

Agradezco de igual manera al Dr. Valentín Mendoza por su asesoría técnica y compañerismo.

A mi compañero Rafael Jaimes por su asesoría y consejos en mi carrera, tal vez sin esas charlas el laboratorio sería otro.

A mi maestro Luis Reséndiz porque la vida da muchas vueltas y uno debe tener la mente fría para tomar decisiones.

Una serie de eventos a lo largo de nuestra vida moldean nuestra personalidad y entre todas nuestras vivencias hay pasajes oscuros y tristes así como momentos claros y alegres y es a quienes han permanecido conmigo en ambos contrastes, mis amigos a quienes les agradezco. A Jarabak por los buenos momentos juntos, a Juan Pablo por tu confianza y consejos y a David Cruz Galicia por tu comprensión apoyo y compañía, gracias chicos.

Y por último mi agradecimiento más especial es para mi familia, mi hermana Marlene, mi madre Judith y mi padre Raunel por que a pesar de todos los eventos sucedidos hemos salido adelante, juntos lo hemos hecho. Madre sin tu amor y constancia no estaría realizando estos proyecto, Marlene eres un gran ejemplo de fortaleza y dedicación y Raunel gracias por procurarnos y ver por nuestro bien ante todo.

RECONOCIMIENTOS

Durante mi aprendizaje en el laboratorio 225 Norte, hubo un equipo que contribuyó de manera indirecta pero importante en mi proyecto, por lo que aprovecho este espacio para agradecerles, en primer lugar a la institución donde llevé a cabo mi proyecto de investigación que es el Instituto de Fisiología Celular y a los miembros de sus unidades de servicio, particularmente al M.V.Z Héctor Malagón Rivero del Bioterio así como a la Dra. Laura Ongay Larios, la B. Sc. Guadalupe Códiz-Huerta y la M. Sc. D. Minerva Mora Cabrera de la Unidad de Biología Molecular, gracias por su asesoría y apoyo técnico así como a todos los miembros del taller porque sin los arreglos de los diferentes equipos, los experimentos se retrasarían más.

Dedicatoria

A mi hermana Marlene, por tu gran fortaleza

A mis padres Judith y Raunel

Abreviaturas

aa	Aminoácidos
ALK 5	<u>Activin Receptor-Like Kinase 5</u>
Ans	Anisomicina
APC	Complejo Promotor de la Anafase
C-Terminal	Carboxilo Terminal
Co-Smad	Smad Común
CHX	Cicloheximida
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
ERK	Cinasa Relacionada a señales extracelulares
FLNa	Proteína filamina A
HAT	Acetilasa de Histonas
HDAC	Desacetilasa de Histonas
I-Smad	Smad Inhibitoria
IP	Inmunoprecipitación
JNK	Cinasa de la Región NH ₂ de Jun
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
MH1	Dominio 1 de unión a MAD
MH2	Dominio 2 de unión a MAD
N-Cor	Correpresor de receptor nuclear
MeCP2	Proteína de unión a CpG metiladas
mSin3A	Componente del core de un complejo correpresor modificador de la cromatina
Puro	Puromicina
R-Smad	Smad activada por el Receptor
Smurf 2	Factor relacionado a la ubiquitinización de las Smads
Ski	Sloan Katherin Institute
SnoN	Ski related Novel gene Non alu containing
TβRII	Receptor Tipo II de TGFβ
TGF-β	Factor de Crecimiento Transformante Beta

Índice de contenido

INTRODUCCIÓN	13
El TGF β	13
La vía canónica del TGF β	13
Regulación de la vía del TGF β	16
Los correpresores Ski y SnoN	17
Características estructurales	18
La estabilidad de las proteínas Ski y SnoN por modificaciones postraduccionales ..	19
Mecanismos de degradación de Ski y SnoN por la vía del TGF β	19
Smurfs	20
Complejo promotor de la Anafase (APC)	21
Arkadia	21
El papel del TGF β en cáncer	22
El proceso de Transición Epitelio-Mesénquima	23
Los procesos de invasión y metástasis	24
Angiogénesis	24
Inmunosupresión	25
Melanoma	25
El papel de Ski y SnoN en melanoma	26
La filamina: características, funciones y relevancia en la vía del TGF β	27
Estructura de la filamina	28
Funciones de la filamina	29
ANTECEDENTES	30
Inhibidores de la síntesis de proteínas que activan MAPK pueden regular negativamente los niveles de SnoN vía proteosoma	30
El efecto de la anisomicina sobre Ski y SnoN es independiente de MAPK y de sus efectos ribotóxicos	30
La degradación de SnoN es dependiente del contexto celular	31
El receptor ALK5 pero no la activación de las R-Smads es importante para mediar la degradación de Ski y SnoN por anisomicina	31

HIPÓTESIS.....	32
OBJETIVO GENERAL.....	33
Objetivos particulares.....	33
MATERIALES Y MÉTODOS	33
Cultivo celular y reactivos.....	33
Tratamientos	34
Transfecciones y generación de líneas celulares M2 estables	34
Inmunoprecipitación (IP)	35
Western Blot.....	35
RESULTADOS	33
La filamina es importante para mediar la degradación de Ski y SnoN por Anisomicina	36
Los antibióticos anisomicina, puromicina y cicloheximida llevan a cabo la degradación de Ski en células A7 de melanoma	37
La actividad de cinasa del receptor ALK 5 es importante para mediar el efecto de la anisomicina en células A7.....	38
El fragmento carboxilo terminal de filamina A, no es capaz de restituir la activación de las R-Smads.....	39
DISCUSIÓN.....	41
CONCLUSIONES	44
REFERENCIAS.....	32
ANEXOS.....	37
Características de los inhibidores de la síntesis de proteínas utilizados.....	37
Lista de los anticuerpos utilizados.....	38
Soluciones Empleadas.....	39

RESUMEN

El TGF β es una citocina pleiotrópica implicada en el mantenimiento de la homeostasis celular, controla procesos como la proliferación, diferenciación, migración, adhesión celular y apoptosis entre otros procesos.

Las proteínas Ski y SnoN son dos reguladores negativos de la señal del TGF β que actúan reprimiendo la actividad transcripcional de los efectores del TGF β : las proteínas R-Smads (2 y 3). Las Smads 2/3 una vez que son activadas por su ligando, pueden regular negativamente a sus correpresores Ski y SnoN.

Los correpresores Ski y SnoN tienen una función importante en cáncer. La modulación de sus niveles proteicos promueven que estas proteínas actúen como oncoproteínas o supresores de tumores. Por lo tanto, determinar compuestos y sus mecanismos de acción que ayuden a modular sus niveles proteicos es relevante para su estudio.

La anisomicina es un antibiótico que promueve la degradación de Ski y SnoN de manera alterna a TGF β en un mecanismo que requiere del receptor tipo I de TGF β (ALK5), pero no así de las proteínas R-Smads activadas.

Entre las moléculas que intervienen en la activación de las R-Smads, se encuentra la proteína de andamiaje filamina A. Debido a que la anisomicina utiliza componentes iniciales de la vía del TGF β , como ALK5, intentamos determinar si filamina es parte del mecanismo empleado por anisomicina para degradar a Ski y SnoN.

En este trabajo, el objetivo consiste en caracterizar el mecanismo de acción de la anisomicina por el que disminuye los niveles proteicos de Ski y SnoN estudiando la participación de la proteína de andamiaje FLNa en este mecanismo. Para esto, se utilizó un modelo de líneas celulares de melanoma (M2) las cuáles carecen de filamina A (FLNa) y sus derivadas A7, a las que se les restituyó la expresión de FLNa. y se determinó que en células que carecen de esta proteína no es posible regular la estabilidad de Ski o SnoN por anisomicina o el propio TGF β , lo que sugiere que FLNa es un componente más en el mecanismo de degradación de Ski y SnoN por anisomicina y TGF β .

EL ANTIBIÓTICO ANISOMICINA INDUCE LA DEGRADACIÓN DE LAS ONCOPROTEÍNAS SNON Y SKI EN CÉLULAS DE MELANOMA

INTRODUCCIÓN

El TGF β

El factor de crecimiento transformante beta, mejor conocido como TGF β , es una citocina multifuncional con un papel muy importante en la regulación de la homeostasis celular; controla la proliferación, diferenciación, migración, adhesión y apoptosis dependiendo del contexto celular (Sosa *et al.* 2004).

Esta citocina es el miembro prototipo de la superfamilia del TGF β , integrada por diferentes factores como: activinas, nodales, miostatina, proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs), la hormona antimulleriana (AMH) así como factores de crecimiento y diferenciación como los GDFs. Muchos de estos miembros participan durante el desarrollo embrionario y la diferenciación celular (Massagué, 1998).

En el ser humano, existen tres isoformas del TGF β : TGF β 1, 2 y 3, de éstas el TGF β 1 es la isoforma más ubicua (Massagué, 1998).

La vía canónica del TGF β

El TGF β es secretado de forma inactiva como un homodímero asociado a la proteína de latencia LAP y es activado mediante un procesamiento proteolítico en el motivo RXXR, localizado en el extremo N-terminal por la endoproteasa furina; aún activo, el TGF β permanece unido de forma no covalente en su porción C-terminal a la proteína LAP (Gentry *et al.* 1988; Dubois *et al.* 2001).

El TGF β activo se une a su receptor transmembranal tipo II (T β RII). Este receptor tiene actividad de cinasa, la cual es constitutivamente activa. Al unirse el ligando a T β RII, se favorece el reclutamiento del receptor tipo I o ALK5 (Activin Receptor-Like Kinase 5) Figura 2. Otros correceptores que facilitan la interacción entre las diferentes isoformas del TGF β con los receptores de TGF β , son el betaglicano y la endogлина. Una vez formado el complejo heterotetramérico de receptores y ligando, el receptor T β RII transfosforila al receptor T β RI en una secuencia rica en serinas y treoninas TTSGSGSG, denominada dominio GS. Esta fosforilación activa a T β RI, el cual propaga la señal intracelular al fosforilar a las proteínas R-Smads (Massagué, 1998).

Las proteínas Smads (denominadas así por la combinación de los nombres SMA: “small body size” y MAD: “Mother Against Decapentaplegic”) son efectores de la vía canónica del TGF β y se clasifican en tres tipos:

- 1) R-Smads o Smads activadas por el receptor; para el TGF β son las Smad2 y 3.
- 2) Co-Smad o Smad común. Es una Smad presente en la señalización de todos los miembros de la superfamilia del TGF β y se denomina Smad4.
- 3) I-Smads o Smads Inhibitorias como Smad6 y Smad7. La Smad6 es un regulador negativo específico para BMPs, mientras que la Smad7 regula tanto la vía de TGF β como la de BMPs.

Las proteínas Smad presentan 3 dominios estructurales característicos, a excepción de las I-Smads que solo presentan dos (Figura 1).

- 1) En la porción N-terminal, el dominio MH1 de 130 aa de las R-smads y Smad4 se caracteriza por permitir la interacción de las Smads con el surco mayor del DNA, a través de la estructura de orquilla- β o “ β -hairpin”. Esto no sucede en Smad2 por contener una inserción en la secuencia de su exón 3 y por tanto, no interactúa con el DNA (*Massagué, 1998*).
- 2) El dominio MH2 de 200 aa, localizado en la porción carboxilo, presenta el motivo SSXS que es fosforilado por el receptor tipo I (como ALK5), así como motivos para favorecer las interacciones con factores transcripcionales y la heterodimerización entre las R- y la Co-Smad (*Massagué, 1998*).
- 3) Entre los dominios MH1 y MH2 se localiza el dominio “linker”. Este exhibe menos consenso en cuanto a tamaño y similitud de secuencia entre las diferentes proteínas Smads y presenta sitios de fosforilación por las vías de MAPK; así mismo, en este dominio se localiza el motivo PY, el cual es necesario para interactuar con el motivo WW de la ligasa de ubiquitina E3: Smurf 2 o NEDD4 2 y regular con ello la estabilidad de estas proteínas y a SnoN (Figura 1) (*Massagué, 1998*).

Una vez que el receptor T β RI (ALK5) fosforila a las R-Smads en el motivo SSXS, que se localiza en su porción carboxilo terminal, permite que las Smads2/3 se asocien con Smad4 y una vez formado el complejo de Smad4/R-Smads, este se transloca al núcleo en donde regula a sus genes blancos al reconocer una secuencia consenso de 5 pares de bases 5'AGAC- 3' denominada SBE (Smads Binding Element) en combinación con otros factores transcripcionales y coactivadores transcripcionales como p300 y CBP (Figura 2) (*Macias-Silva et al. 1996; Massagué, 1998*).

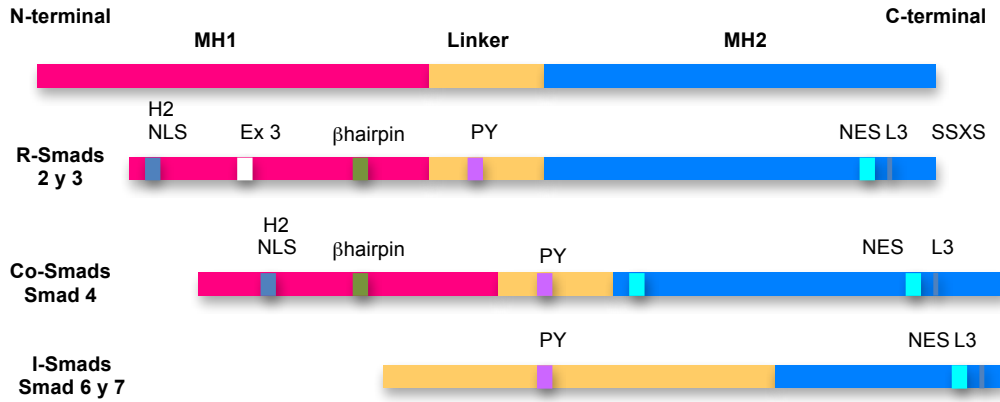


Figura 1. Esquema de los dominios estructurales de las Smads. En la imagen superior, se muestra un esquema general de los dominios de las Smads. Abajo, en detalle, se muestran algunas estructuras adicionales características de los diferentes tipos de Smads: R-Smads, Co-Smad e I- Smad. NLS (señal de localización nuclear), H2 (α hélice 2 de importe nuclear), NES (señal de exporte nuclear), Ex3 (sitio de inserción en el exón 3 en Smad2), β -hairpin (horquilla que permite la interacción con el surco mayor del DNA) L3 (loop3, sitio de interacción con T β RI), motivo PY (rico en residuos de prolina, reconocido por las Smurfs), SSXS motivo de fosforilación en el carboxilo terminal por T β RI. Modificado de Sosa *et al.* 2004

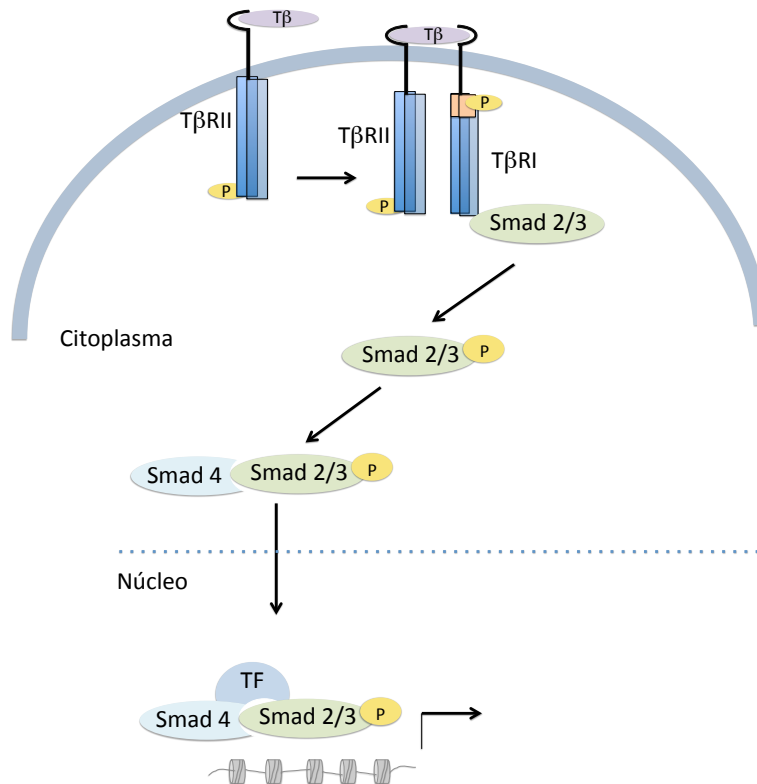


Figura2 Vía de señalización canónica del TGF β . La señal inicia con la unión del ligando al receptor T β RII quien después, transfosforila a T β RI en su dominio GS para activarlo y permitir la propagación intracelular de la señal de TGF β a través de la fosforilación de las R-Smads (2 y 3). Estas proteínas activadas se asocian con Smad 4 y se translocan al núcleo donde regulan a sus genes blanco interactuando con otros factores transcripcionales, cofactores, correpresores y remodeladores de cromatina.

Regulación de la vía del TGF β

La señalización del TGF β es finamente regulada a diferentes niveles por diversos factores entre los que se encuentran: las I-Smads, ligasas de ubiquitina E3, y los correpresores transcripcionales Ski y SnoN, entre otros. A continuación, se describen algunos mecanismos empleados por algunos reguladores de esta vía de señalización.

Regulación de la vía del TGF β por Smad7

A un nivel inicial en la cascada de señalización, la proteína Smad7 –que es una Smad inhibitoria inducida por el propio TGF β –, compite con las R-Smads por la unión al dominio de cinasa del receptor ALK5. Este receptor es incapaz de fosforilar a Smad7 porque esta proteína, carece del motivo SSXS presente en las R-Smads y como consecuencia no se transduce la señal por el ligando (Ten Dijke *et al.* 2004).

Otros mecanismos llevados a cabo por Smad7 para regular negativamente la vía de TGF β , implican que Smad7 funcione como un adaptador dual tanto para ligasas de ubiquitina E3, como las Smurfs1/2 (“Smad ubiquitination-related factor”) vía interacción con su motivo PYY desubiquitininasas (DUBs) como Usp15 (Kavsak *et al.* 2000; Ten Dijke *et al.* 2004; Xiaohua *et al.* 2011; Eichhorn *et al.* 2012).

Cuando Smad7 se asocia con ALK5 y las Smurfs1/2, se promueve la degradación del receptor vía el proteosoma, que involucra su endocitosis mediante vesículas de caveolina (Ten Dijke *et al.* 2004).

Por su parte, la regulación negativa de Smad7 es llevada a cabo por otra ligasa de ubiquitina E3 llamada Arkadia (Koinuma *et al.* 2003).

Regulación de los efectores R-Smad y Smad4

Las R-Smad o Co-Smad pueden ser reguladas por proteínas independientes. En el caso de Smad4, esta puede ser regulada por procesos de mono- y des-ubiquitinación en la lisina 519 por las proteínas Ectodermín/Tif1- γ /Trim33 y FAM/Usp9x respectivamente, impidiendo su asociación con las R-Smads a nivel nuclear, y promoviendo su degradación vía el proteosoma (Dupont *et al.* 2012).

En tanto, las R-Smad son degradadas vía el sistema ubiquitina-proteosoma (UPS) por su interacción con ligasas de ubiquitina tipo HECT (“Homologous to the E6-accessory protein C-Terminus”) como las Smurf2 que mediante su dominio WW interactúan con el motivo PY del dominio “linker” de las R-Smads (Xia *et al.* 2000). Por otra parte, la monoubiquitinación de las R-Smad en las lisinas K38 y K81 favorece la interacción de estas con el DNA y su

desubiquitinación por Usp15 disminuye su eficiencia para regular a sus genes blanco (Dupont *et al.* 2012).

Regulación de la vía del TGF β por Ski y SnoN

A nivel citoplásmico, la vía del TGF β también puede ser regulada por dos correpresores: Ski y SnoN. Estos bloquean los efectos del TGF β por su unión a ALK5 e impiden la translocación de los complejos R-Smads-Smad4 al núcleo (Ferrand *et al.* 2010). También, al interactuar con estas proteínas a través de su N-Terminal y el dominio SAND respectivamente de estos efectores, imposibilitan la formación de los heterocomplejos de Smads y nuevamente su translocación nuclear, necesarios para llevar a cabo la transcripción de sus genes blanco (Krakowski *et al.* 2005; Bonnon *et al.* 2012). A un nivel transcripcional, Ski y SnoN pueden bloquear la asociación de las Smads con coactivadores transcripcionales como p300 y CBP, reclutando en su lugar a otros correpresores como NCoR, mSin3A y HDACs para condensar la cromatina (Figura 3) (Bonnon *et al.* 2012).

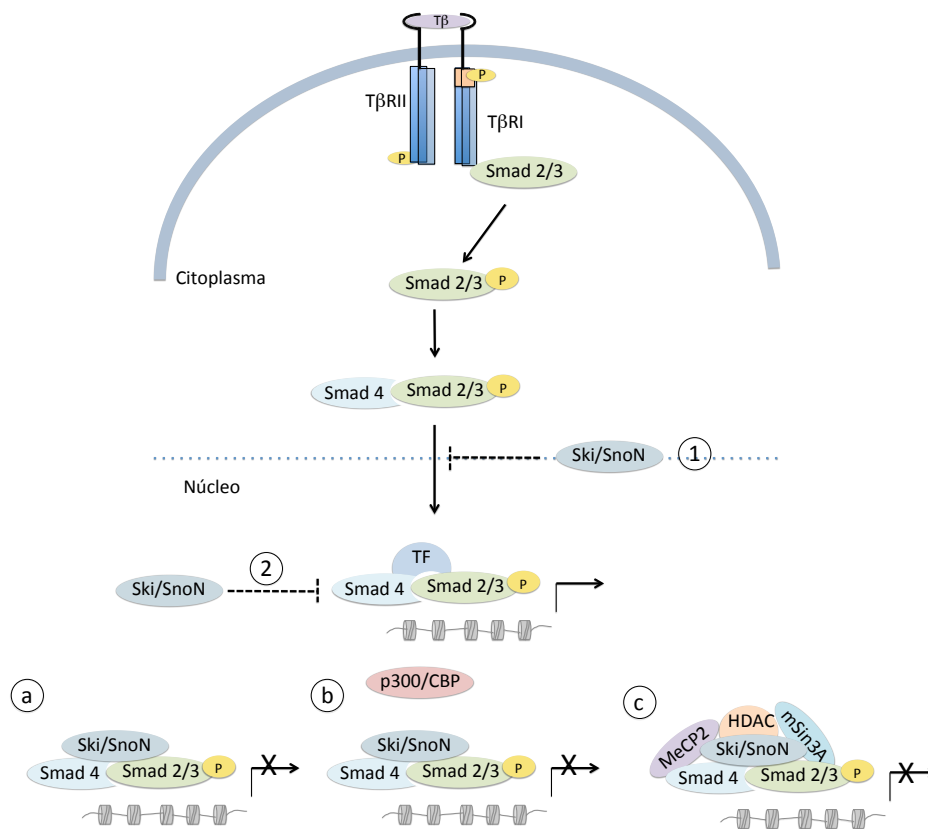


Figura 3 Mecanismos de regulación de la Vía del TGF β por Ski y SnoN. (1) En citoplasma, Ski establece complejos con las Smad 2/3 y 4, evitando su translocación nuclear. Por su parte, a nivel nuclear, Ski y SnoN evitan la activación de las Smads por diferentes vías (a) Inactiva a los complejos de Smads en el DNA, (b) impiden el reclutamiento de coactivadores transcripcionales como p300 y CBP y en (c) Ski y SnoN reclutan correpresores como MeCP2, HDACs y mSin3A. Modificado de (Bonnon *et al.* 2012).

Los correpresores Ski y SnoN

La oncoproteína Ski está codificada por el gen de Ski. Fue denominada así por el “Sloan Kettering Institute”, lugar en donde se identificó inicialmente como un gen presente en un grupo de retrovirus de células embrionarias de ave en el año de 1986. El gen v-Ski, presenta una secuencia similar en el genoma de pollo, y esta secuencia presenta ortólogos en otros metazoarios como *Danio rerio*, *Xenopus laevis*, *Drosophila melanogaster* y *Homo sapiens*. Posterior a la identificación de Ski, se encontró por homología de secuencia a Skil (“Ski-like”) que codifica para la proteína SnoN (Domínguez *et al.* 2010).

Características estructurales

Estructuralmente las proteínas Ski y SnoN contienen dominios específicos para mediar sus interacciones proteína-proteína, entre estos se encuentran, en la porción N-terminal dos dominios: el más conservado y que define a la familia es el DHD (“Dachshund homology Domain”), el cual permite mediar interacciones entre las proteínas que lo presentan con el DNA; sin embargo, por detalles cristalográficos entre la conformación 3D del dominio y la superficie de unión a DNA, han demostrado que Ski y SnoN son incapaces de unirse directamente al DNA.

El segundo dominio en la porción N-terminal es el dominio SAND, el cual se caracteriza por presentarse en proteínas nucleares involucradas en la regulación transcripcional dependiente de cromatina; aunque en Ski, este motivo permite su interacción con Smad4 y con las R-Smads (Figura 4) (Domínguez *et al.* 2010; Bonnon *et al.* 2012).

La porción carboxilo es la menos conservada entre los miembros de la familia de Ski y permite mediar la homo- y hetero-dimerización entre Ski y SnoN (Domínguez *et al.* 2010; Bonnon *et al.* 2012).

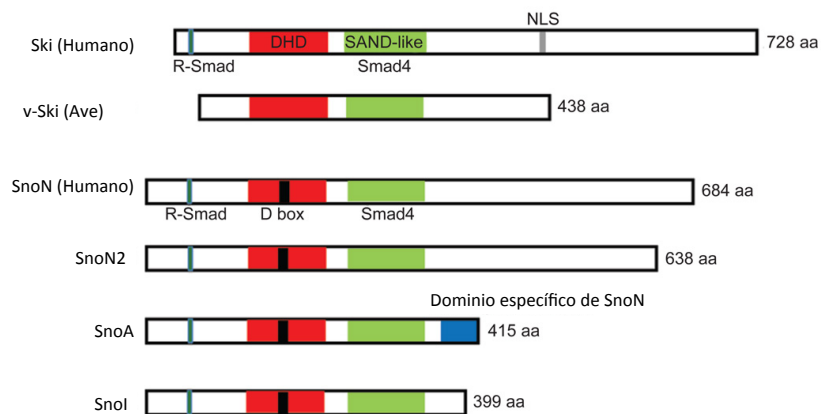


Figura 4 Dominios estructurales de la familia de Ski. Se resaltan los dominios estructurales característicos. En el N-terminal se muestra el DHS y SAND. También se muestran las isoformas de SnoN en humano como: SnoN2, SnoA y SnoI Tomado de Bonnon *et al.* 2012

La estabilidad de las proteínas Ski y SnoN por modificaciones postraduccionales

Los niveles proteicos y la sublocalización celular de los correpresores Ski y SnoN son relevantes para modular la cascada de señalización del TGF β en diferentes contextos fisiológicos como la regeneración hepática y el desarrollo embrionario y patológicos como el cáncer.

En el cáncer, ambas proteínas exhiben un papel dual como supresores de tumores u oncoproteínas (Shinagawa *et al.* 2000; Zhu *et al.* 2007). En la regeneración hepática existe un incremento en los niveles proteicos de Ski y SnoN, posiblemente para antagonizar los efectos antiproliferativos del TGF β , lo que podría ser contrario a lo que ocurre en fibrosis (Macías Silva *et al.* 2002; Cai *et al.* 2006). Durante el desarrollo embrionario, Ski es importante para el desarrollo del sistema nervioso, la producción de mielina y la miogénesis, entre otros procesos (Atanasoski *et al.* 2004; Berk *et al.* 1997).

Existe evidencia de que para regular la estabilidad y función de Ski o SnoN están involucradas las modificaciones postraduccionales: marcas covalentes como la fosforilación, ubiquitinación, sumoilación o acetilación, entre otras. Así, la fosforilación de SnoN por la cinasa TAK1 vuelve más susceptible a SnoN para ser ubiquitinada y degradada vía el proteosoma (Kajino *et al.* 2007). Su sumoilación por PIAS1 y PIASx promueven la expresión de genes específicos de músculo (Wrighton *et al.* 2007). Por su parte, Ski puede ser fosforilado por Akt en la treonina 458 y causar su desestabilización (Arja *et al.* 2009). En el siguiente apartado, se hará énfasis en el efecto que tiene la ubiquitinación sobre la estabilidad de Ski y SnoN.

Mecanismos de degradación de Ski y SnoN por la vía del TGF β

Se ha mencionado la ubiquitinación como una modificación para controlar la estabilidad de las proteínas; sin embargo, esta modificación puede presentarse de diversas maneras y tener diferentes funciones. Así, la adición de un monómero de ubiquitina en una lisina puede funcionar como un motivo para mediar interacciones proteína-proteína y la adición de varios monómeros de ubiquitina, en diferentes residuos de lisinas denominado oligoubiquitinación, puede mediar la localización de una proteína; mientras que la adición de varias unidades de ubiquitina, en un único residuo de lisina (poliubiquitinación), es una marca que caracteriza a las proteínas para que sean degradadas vía el sistema ubiquitina proteosoma (UPS), (Dupont *et al.* 2012).

La vía de proteosoma es una vía proteolítica dependiente de ATP, llevada a cabo tanto en el núcleo como en el citoplasma de las células eucariontes (Coux *et al.* 1996). Este proceso implica la acción de 3 enzimas: una enzima que activa la ubiquitina (E1), una

enzima de conjugación que media la transferencia de la ubiquitina a la proteína blanco (E2) y por último una enzima que realiza la transferencia completa de la ubiquitina a la proteína blanco, la ligasa de ubiquitina (E3) (Dupont *et al.* 2012).

Las proteínas Ski y SnoN pueden ser reguladas negativamente por los efectores del TGF β , las Smad2/3 que al ser activadas por fosforilación, actúan como adaptadores para diferentes ligasas de ubiquitina E3 como Smurf2, el complejo promotor de la Anafase (APC) y Arkadia, quevía el proteosoma llevan a la degradación a los correpresores Ski y SnoN (Peters, 1999; Bonni *et al.* 2001; Nagano *et al.* 2007).

Es preciso mencionar que a diferencia de Ski, SnoN es regulado tanto a nivel de proteína como de gen por TGF β . A nivel transcripcional, TGF β induce la expresión del gen de SnoN (SKIL) razón por la cuál en un curso temporal con TGF β al evaluar los niveles de proteína se observa como a tiempos cortos hay una disminución en los niveles de SnoN por efecto de su degradación por TGF β , en tanto que a tiempo de 2 hrs hay un aumento en los niveles de SnoN como consecuencia de la inducción de su gen por TGF β .

Mecanismos moleculares utilizados por las diferentes ligasas de ubiquitina E3 que unen a las proteínas Smad para degradar a Ski o SnoN

He mencionado que existen diferentes mecanismos moleculares empleados por las R-Smads para regular negativamente a sus correpresores Ski y SnoN, utilizando ligasas de ubiquitina E3 como: Smurf2, APC y Arkadia por mencionar algunas y de las cuáles detallaré su mecanismo de acción mostrando en la Figura 5 un resumen de las mismas.

-Smurfs

Las Smurfs (“Smad Ubiquitin Related Factor”) son ligasas de ubiquitina E3 de la familia HECT y pertenecen a la subfamilia C2-WW. Esta subfamilia se caracteriza por presentar un dominio de unión a fosfolípidos de manera dependiente de calcio localizado en el extremo amino de la proteína (Bonni *et al.*; 2001).

Las proteínas Smurf pueden mediar la degradación de SnoN dependiendo del estímulo con TGF β utilizando a las R-Smads como adaptadores. La proteína Smurf2 interacciona a través de su dominio WW con el motivo PY en la región linker de Smad2 y esta puede interactuar simultáneamente con SnoN. La unión de Smad2 con Smurf2 favorece la interacción del dominio HECT de Smurf2 (el cual posee la actividad catalítica para transferir la ubiquitina) al dominio carboxilo de SnoN, promoviendo con ello su marcaje con ubiquitina y degradado vía proteosoma (Bonni *et al.* 2001) Figura 5a.

-Complejo promotor de la Anafase (APC) y Cdc34

Los niveles proteicos de Ski y SnoN son regulados durante la progresión del ciclo celular a través de la vía ubiquitina-proteosoma e involucra a las proteínas cdc34 en el caso de Ski y el complejo promotor de la anafase (APC) para SnoN.

La APC es un complejo conformado por 11 subunidades, de las cuales APC 11 es quien tiene la capacidad de ligasa de ubiquitina con una estructura de tipo "RING-finger". Para llevar a cabo su actividad de ligasa, esta proteína se asocia con las proteínas CDC20 y CDH1 que le confieren especificidad para actuar sobre los motivos de destrucción (D-box) de sus proteínas blanco durante la mitosis o la fase G1, respectivamente (Peters, 1999).

La proteína SnoN contiene un motivo D-box que media su interacción con CDH1-APC y sus aminoácidos 230 y 280 promueven su poliubiquitinación en las lisinas 440, 446 y 449. Como resultado de su interacción con APC, SnoN es degradado durante la mitosis (Stroschein *et al.* 2001) Figura 5b.

Por su parte, proteína Cdc34 es enzima que conjuga la ubiquitina E2, que poliubiquitina a Ski de manera independiente a su motivo D-box y promueve su degradación durante la interfase pero no así en mitosis donde los niveles de esta proteína se estabilizan, contrario a lo ocurrido con SnoN que es estabilizado en interfase y degradado durante la mitosis (Macdonald *et al.* 2004)Figura 5c.

-Arkadia

La proteína Arkadia, también conocida como "RING-finger 111", es una ligasa de ubiquitina E3 que se identificó inicialmente como potenciadora de la señalización nodal en *Xenopus*. Al igual que las Smurf1 y 2, regula a varios componentes de la vía del TGF β , como a las proteínas Smad2, 3 y 7, así como a los correpresores Ski y SnoN. El dominio RING de arkadia en su C-terminal interacciona con el dominio SAND de Ski y SnoN, entre los aminoácidos 263–355, llevando a la poliubiquitinación y posterior degradación de estos correpresores vía el proteosoma (Nagano *et al.* 2007) Figura 5d.

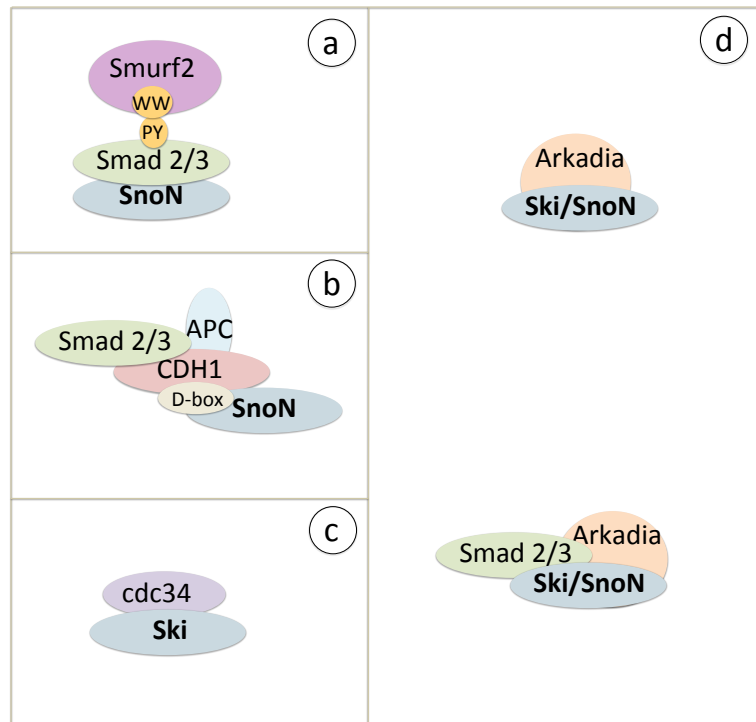


Figura 5 Esquema que representa las asociaciones entre ligasas de ubiquitina E3 y E2 con Ski y SnoN. (a) Smad2 favorece la interacción entre Smurf 2 y SnoN al interactuar el motivo PY de estas con el WW de Smurf2. (b) Smad2/3 y CDH1 median la interacción entre SnoN y APC a través del motivo D-box de SnoN. (c) Interacción de cdc34 con Ski durante la interface. (d) Arkadia interacciona con Ski o SnoN de forma libre o en asociación con las Smads2/3.

El papel del TGF β en cáncer

El cáncer es un término genérico para designar a un grupo de enfermedades que se caracterizan por presentar una alta tasa de proliferación celular anormal que puede extenderse hasta invadir tejidos adyacentes o distales, en un proceso conocido como metástasis. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud el cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo; tan solo en el 2008, el cáncer causó la muerte del 13% de la población mundial.

Como se ha mencionado, la vía de señalización del TGF β puede inducir arresto en el ciclo celular o causar apoptosis en ciertos contextos celulares; sin embargo, en el desarrollo del cáncer, el TGF β puede ser promotor del desarrollo de tumores, favoreciendo procesos como la invasión celular, la diseminación, la evasión del sistema inmune por parte de las células cancerosas, la angiogénesis y la transición epitelio-mesénquima (EMT), muy importante durante la metástasis, por mencionar algunas de sus acciones (Massagué 2008; Meulmeester *et al.* 2010).

El papel dual del TGF β en cáncer, se ha asociado con alteraciones en sus componentes de señalización que abarcan desde los receptores hasta las Smads.

En el caso de los receptores, a T β RII se le asocian alteraciones que van desde mutaciones sin sentido en cánceres con inestabilidad de microsatélites –que son secuencias cortas de elementos repetidos que varían en las células tumorales– que afectan su dominio de cinasa de serina y treonina como en el cáncer de colon, hasta la pérdida de su expresión por mutaciones en la región promotora del gen que lo codifica (Levy *et al.* 2006).

En cuanto al receptor tipo I ALK5, este presenta mutaciones en su secuencia en carcinoma de mama; pero la principal alteración asociada a esta proteína se relaciona con la pérdida de expresión de su RNA mensajero por la hipermetilación del DNA en las islas CpG en el promotor del gen que lo codifica, observado principalmente en carcinomas gástricos (Levy *et al.* 2006).

Por otro lado, en cáncer pancreático se han encontrado deleciones del gen que codifica para Smad4 en un 30% y entre el 8-17% se han identificado en cáncer de mama, ovario, pulmón, vejiga y conducto biliar, entre otros. A pesar de la asociación de la pérdida de expresión de Smad4 en algunos tipos de cáncer, existen modelos murinos a los que se les depleta Smad4 y que no desarrollan tumores *de novo*, recalcando el hecho de que la mutación *per se* no es el único desencadenante para promover el desarrollo del cáncer, sino que el microambiente también debe ser considerado (Meulmeester *et al.* 2010).

El gen de *Smad2*, a pesar de encontrarse cerca del locus del gen de *Smad4*, no presenta mutaciones con alta frecuencia y las que existen reportadas, son mutaciones sin sentido que afectan su dominio MH1 o MH2. En contraste, no se han asociado mutaciones para Smad3, pero sí una pérdida de su expresión en cáncer gástrico (Levy *et al.* 2006; Meulmeester *et al.* 2010).

El TGF β es un importante modulador del microambiente tumoral y para explicar un poco más sobre como el TGF β ejerce sus acciones en el desarrollo tumoral se describen a continuación los mecanismos implicados en la transición epitelio mesénquima, la invasión, la metástasis y la evasión inmune.

El proceso de Transición Epitelio-Mesénquima

La transición epitelio-mesénquima (TEM) es un proceso de transdiferenciación de una célula epitelial a una mesenquimatosa, confiere a la célula la capacidad para migrar e invadir su tejido circundante. Este proceso se caracteriza por la pérdida de las uniones célula-célula y célula-matriz, así como la pérdida de polaridad celular y la degradación de la matriz extracelular, lo cual se correlaciona con la disminución o ausencia de marcadores epiteliales como la E-caderina y con un aumento en la expresión de marcadores mesenquimatosos como la α -actina de músculo liso y la vimentina (Meulmeester *et al.* 2010). El TGF β es capaz de inducir este proceso vía las proteínas Smad3 y Smad4, no así

con Smad2. También, la porción intracelular del receptor T β RI al ser cortada por la metaloproteasa TACE, permite que se transloque al núcleo induciendo la expresión de metaloproteasas y del factor transcripcional Snail, implicado en el silenciamiento de E-caderina, la supervivencia celular y la adquisición de un fenotipo mesenquimatoso en las células epiteliales (Barrallo *et al.* 2005; Heldin *et al.* 2012).

Los procesos de Invasión y Metástasis

El TGF β es una citocina conocida por inhibir la proliferación en células epiteliales, neuronales y hematopoyéticas, induciendo la expresión de inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (CDKs) como p15 y p21 a través de sus efectores las Smads3 y 4 y los factores transcripcionales FoxO y Sp1, así como a través de la represión de c-Myc arrojando a las células en fase G1 (Meulmeester *et al.* 2010).

En cáncer, la comunicación cruzada entre la vía del TGF β y las diferentes vías de señalización de una célula –particularmente las de MAPK como p38, Erk1/2 y JNK, así como de proteínas G pequeñas como Ras y Rho– se ha considerado que permite la expresión de moléculas implicadas en la motilidad de células cancerosas, y el silenciamiento de inhibidores de CDKs (Meulmeester *et al.* 2010).

Una vez que las células cancerosas invaden su tejido circundante, pueden continuar con el proceso de metástasis, el cual involucra una serie de pasos que van desde la intravasación, la diseminación en torrente sanguíneo y la extravasación, para asentarse en un nuevo sitio y proliferar hasta formar un nuevo tumor. Se ha observado, mediante inmunohistoquímica, una mayor presencia de TGF β en células metastásicas con relación a células de tumores primarios. En cáncer de mama y de próstata, en los que puede haber metástasis hacia hueso, se ha determinado que el TGF β es capaz de mediar la activación de osteoclastos y la producción de enzimas osteolíticas que ayudan a la reabsorción ósea; en tanto que para mediar la metástasis hacia pulmón, el TGF β induce la expresión del gen que codifica para la proteína relacionada a la Angiopietina 4 (ANGPTL4), la cual ayuda a las células tumorales a penetrar a las paredes endoteliales de los capilares y así mediar la metástasis (Meulmeester *et al.* 2010).

Angiogénesis

Para que las células puedan sobrevivir, éstas requieren de entre múltiples factores, un aporte de oxígeno. Para el desarrollo de tumores, es necesario el establecimiento de nuevos vasos sanguíneos para su crecimiento y el TGF β que es sustancialmente secretado por las células tumorales es capaz de inducir la expresión del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) y genera una señal para el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos para nutrir al tumor (Benckert *et al.* 2003).

Inmunosupresión

Se ha reportado que el TGF β actúa como un inhibidor de la proliferación y la diferenciación de linfocitos B y T, al igual que reprime la actividad de las células NK (“Natural Killer”), lo que podría tener como resultado la formación de un escudo de inmunosupresión en los tumores, al haber una gran secreción de esta citocina por parte de las células tumorales, lo que permitiría a las células cancerosas evadir su reconocimiento y aumentar su sobrevivencia (Meulmeester *et al.* 2010; Pardali *et al.* 2012).

Melanoma

El melanoma cutáneo es un cáncer derivado de los melanocitos que puede desarrollarse también en la piel, los ojos, el cerebro o en las mucosas. Este tipo de cáncer representa solo el 4% de todos los cánceres cutáneos, pero es la fuente del 80% de los padecimientos de cáncer de piel (Javelaud *et al.* 2008). En México ocurren alrededor de 1000 casos anuales, de acuerdo a datos de la Sociedad Mexicana de Oncología.

La displasia consiste de dos fases: la fase de crecimiento radial que solo se desarrolla en la epidermis y la fase de crecimiento vertical que involucra la invasión hacia la dermis y el tejido subcutáneo (Hendrix *et al.* 2008).

Morfológicamente, su diagnóstico se realiza considerando que la lesión pigmentada presente las siguientes características: sea asimétrica con bordes irregulares, de color no homogéneo y mayor a 6 mm (Champion *et al.* 1994). Para fines clínicos, la progresión de esta enfermedad se clasifica de acuerdo al índice de Clark, el cual considera IV etapas que evalúan: el tamaño del tumor, la invasión, diseminación hacia nódulos y la metástasis. La progresión de las etapas indica disminución en la esperanza de vida de la persona (Clark *et al.* 1969).

La Etapa I se caracteriza porque la lesión se localiza sólo en la epidermis y conforme las células proliferan, estas comienzan a invadir la dermis (la cual se clasifica en papilar o reticular). La Etapa II se desarrolla sólo en la etapa papilar y en la Etapa III, la enfermedad invade hasta la dermis reticular. La última etapa, IV, es cuando la invasión alcanza el tejido subcutáneo (Clark *et al.* 1969).

En cuanto a los mecanismos moleculares en las células de melanoma (particularmente las de estadios más avanzados) estas células se caracterizan por tener una plasticidad funcional, que facilita su resistencia al sistema inmunológico, sobrevivencia y evasión inmune. Esta condición se ha asociado a un fenotipo similar al de una célula troncal, debido a que manifiestan una reducción en la expresión de marcadores específicos de melanocitos como Melan A y Tirosinasa, pero aumentan la expresión simultánea de genes pertenecientes a diferentes tipos celulares como VE-Caderina, queratinas, receptores para

Notch, Wnt5a entre otros; así mismo, en estas células se promueve la expresión de proteínas características del desarrollo como la Nodal, que esta implicada en el mantenimiento de la pluripotencia, al inhibir la diferenciación de células troncales embrionarias (Topczewska *et al.* 2006; Postovit *et al.* 2008). Particularmente la expresión de Nodal se correlaciona con la progresión del melanoma, así como la expresión de Notch4 quién regula la señal de Nodal (Postovit *et al.* 2007).

Parte de esa desregulación transcripcional considera tanto alteraciones genéticas como epigenéticas. La epigenética se define como aquellos elementos hereditarios no dependientes de la secuencia de DNA y las alteraciones encontradas son aquellas relacionadas a las subunidades BAFs de los complejos remodeladores de la cromatina SWI/SNF dependientes de ATP (Vinod *et al.* 2010); cambios en la homeostasis de la metilación del DNA, en donde se exhibe una hipometilación general e hipermetilación de genes específicos (Sigaloti *et al.* 2010). Por todo el contexto mencionado, las células de cáncer de melanoma se adecuan al modelo del progenitor epigenético para explicar el cáncer (Feinberg 2006).

Contrario a lo citado en otros tipos de cáncer, en las revisiones de Melanoma no se han reportado hasta el momento alteraciones en los componentes de señalización del TGF β (Jeveldaud *et al.* 2008; Busse *et al.* 2011). Lo que sí se ha asociado a está enfermedad en relación al TGF β , es la expresión diferencial de sus isoformas; ya que el TGF β 2 y el betaglicano, un correceptor que facilita la interacción de esta isoforma con los receptores T β RII y T β RI, aumentan sus niveles conforme a la progresión del tumor (Albino *etal.* 19991; Busse *et al.* 2011).

El papel de Ski y SnoN en melanoma

En cáncer, Ski y SnoN presentan un papel dual como supresores de tumores y como oncoproteínas. Las proteínas Ski y SnoN se han encontrado sobreexpresadas en cáncer de mama, colorectal, colon, pulmón, melanoma y osteosarcoma (Levy *et al.* 2006; Zhu *et al.* 2007). En estos casos, es posible que ambas proteínas se opongan a los efectos antiproliferativos del TGF β y favorezcan la proliferacion de las células cancerosas (Deheuninck *et al.* 2009; Bonnon *et al.* 2012).

Por otra parte, hay evidencia de que la delección de una copia del gen SnoN en ratones provoca un incremento en la suceptibilidad de estos para inducir la formación de tumores por exposición a carcinógenos (Shinagawa *et al.* 2000); mientras que la reducción de la expresión de SnoN con un shRNA, si bien inhibe la proliferación de las células cancerosas *in vivo* e *in vitro*, también promueve la transición epitelio-mesénquima y la metástasis, evidenciando su papel como supresores de tumores (Zhu *et al.* 2007).

Hasta el momento, existen dos posturas sobre el papel que juegan Ski y SnoN en la progresión del melanoma y sus funciones antagónicas con la citocina TGF β : El grupo de la Doctora Estela Medrano sustenta que Ski es clave para mediar la represión de los efectos inhibitorios del TGF β en melanoma y sus niveles de expresión se correlacionan con la progresión de la enfermedad (Reed *et al.* 1994; Reed *et al.* 2001). En tanto, el grupo de los Doctores Alan Mauviel y Kunxin Luo concuerdan que si bien existe una sobreexpresión de Ski y SnoN en melanoma, estas proteínas no están implicadas en la capacidad invasiva de estas células y además, de acuerdo a sus datos, no hay una correlación entre los altos niveles de Ski con la invasión y metástasis. Así mismo, ellos señalan que la señal del TGF β no está totalmente inhibida por estas proteínas, debido a que en ensayos con genes reporteros hay respuesta transcripcional en respuesta a esta citocina, lo cual indicaría que las R-smads pueden regular a sus genes blanco independientemente de sus correpresores (Jeveldaud *et al.* 2011).

De acuerdo a lo anterior, el papel que juegan los efectores de TGF β y las proteínas Ski y SnoN en el desarrollo del melanoma es mucho más complejo de lo que se podría suponer. Actualmente se han reportado otras moléculas como la filamina, que son capaces de mediar la activación de las Smads en melanoma y es posible que esta proteína de unión a actina, pueda ser relevante en el proceso de degradación de Ski y SnoN por TGF β o bien ser requerida en el mecanismo de acción de la Anisomicina en una vía independiente de la activación de las R-Smads.

La Filamina: Características, funciones y relevancia en la vía del TGF β

La Filamina, denominada así por su patrón filamentososo, fue la primera proteína de una familia de proteínas no musculares de unión a actina, identificada en los macrófagos alveolares de conejo (Hartwig *et al.* 1975; Wang *et al.* 1975).

En mamíferos, la filamina presenta 3 isoformas codificadas por 3 genes distintos localizados en los cromosomas X, 3 y 7 y se denominan FLNA, FLNB y FLNC respectivamente; la última se restringe al músculo esquelético y cardíaco. A nivel de secuencia de aminoácidos (aa), las 3 formas muestran una homología del 60-80% (Feng *et al.* 2004).

La filamina es una proteína de andamiaje que interactúa con 90 proteínas diferentes entre las que se incluyen: actina, receptores, canales, factores transcripcionales, moléculas de señalización intracelular como las Smads, integrinas, entre otras (Sasaki *et al.* 2001; Nakamura *et al.* 2011). La mayoría de estas interacciones se dan con las repeticiones 16-24 localizadas en el extremo C-terminal de la filamina (Zhou *et al.* 2009).

Para regular estas múltiples interacciones, es posible que diferentes factores entren en juego, como la fuerza mecánica, la proteólisis, modificaciones postraduccionales como la fosforilación, ubiquitinación o bien la competencia entre las diferentes moléculas (Nakamura *et al.* 2011).

Estructura de la filamina

La cadena polipeptídica de Filamina es un peso aproximado de 280 kDa, razón por la que se le denomina ABP-280 (Actin Binding Protein 280). Estructuralmente, la filamina se compone de dos homo- o hetero-dímeros; cada uno consiste de una porción N-terminal que contiene 2 dominios en tándem de calponina (CDH1, CDH2) para mediar su unión con β -espectrina, α -actinina y distrofina, así como de dominios de unión a actina (Nakamura *et al.* 2011).

En su esqueleto, la filamina contiene 24 repeticiones de láminas β anti-paralelas con una estructura similar al de las inmunoglobulinas, interrumpidas por dos asas (loops) flexibles, sensibles a proteólisis por calpains de 30 aa con función de bizagra que separan las repeticiones 1-15 y 16-23. Por su parte, en el extremo C-terminal, se localiza el dominio de dimerización en la repetición 24 de cada monómero de filamina, lo que permite la formación de una estructura en forma de V, importante para organizar los filamentos de actina en redes ortogonales (Figura 6) (Weihsing 1988; Feng *et al.* 2004; Nakamura *et al.* 2011).

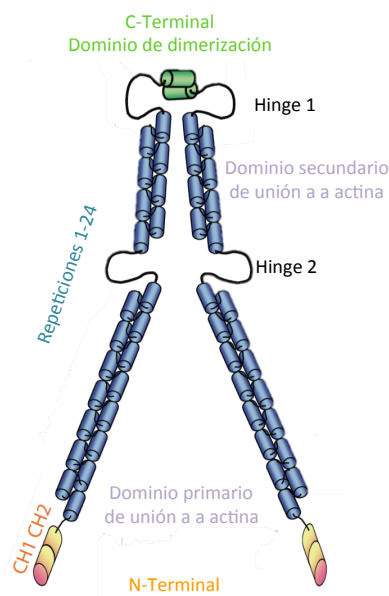


Figura 6 Estructura de la Filamina. Se muestran dos dímeros de Filamina unidos por la repetición 24 en el dominio C-terminal. Las 24 repeticiones que componen cada dímero se discontinúan por los sitios Hinge o bizagra donde la Filamina puede sufrir proteólisis, y en el N-terminal se localizan los dominios de unión a actina así como los dos dominios de homología de calponina. Modificado de Zhou *et al.* 2009 y Nakamura *et al.* 2011

Funciones de la filamina

Inicialmente al determinarse que la filamina era una proteína de unión a actina, se vio que esta proteína, era capaz de establecer redes ortogonales con las fibras de actina, y con el paso de los años debido a las múltiples moléculas con las que interacciona, se considera a la filamina como un integrador de señales, de las cuáles las principales con las que se ha asociado son aquellas relacionadas a la adhesión celular, la señalización por integrinas, y la coordinación de la activación de GTPasas, que en conjunto se encuentran involucradas en la migración celular. En la Figura 7 se resumen algunas de las interacciones moleculares de la filamina.

Como se ha mencionado previamente, la filamina es capaz de interactuar con factores transcripcionales, y en el año 2001, el grupo de Watanabe mostró que la Filamina A estaba implicada en la activación de los efectores transcripcionales del TGF β , las R-Smads. Este grupo determinó que la filamina interacciona a través de sus repeticiones 20-23 con el dominio MH1 y linker de las R-smads y una porción trunca de la filamina con estas repeticiones es suficiente para permitir la fosforilación de las R-Smads. Sin embargo, aún no está establecido si la filamina también interviene en el mecanismo de degradación de los correceptores Ski y SnoN por ligasas de ubiquitina E3 conocidas para el TGF β y por consiguiente, tampoco se sabe si podría ser requerida por el antibiótico anisomicina para mediar la degradación de las proteínas Ski y SnoN (Sasaki *et al.* 2001).

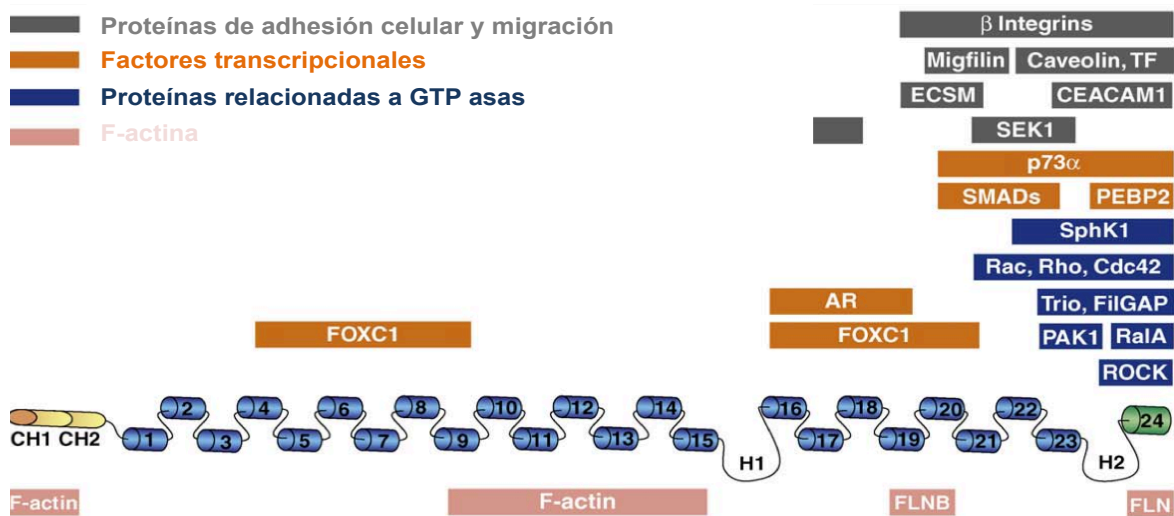


Fig 7 Esquema que muestra algunas de las moléculas con la que interactúa la Filamina. En 4 categorías se resumen dichas moléculas y estos son: 1) proteínas de adhesión celular y migración, 2) Factores transcripcionales como las Smads, 3) Proteínas relacionadas a GTPasas y 4) los dominios de unión a actina. En la ejemplificación solo se considera un monómero de la proteína por simplicidad. Modificado de Zhu *et al.* 2009

ANTECEDENTES

Inhibidores de la síntesis de proteínas que activan MAPK pueden regular negativamente los niveles de SnoN vía proteosoma

Debido a que la fosforilación por MAPK de un correpresor de la vía del TGF β denominado TGIF regula positivamente la estabilidad de esa proteína (Kajino *et al.* 2007), se decidió probar en nuestro laboratorio un antibiótico, capaz de inhibir la síntesis de proteínas y además funcionar como un potente activador de vías de estrés como p38, JNK y MAPKs, llamado anisomicina (Ans). El objetivo consistió en investigar si la activación de vías de estrés podrían regular los niveles de expresión de los correpresores de la vía del TGF β , Ski y SnoN; para sorpresa de nuestro grupo, se encontró que este compuesto, así como otros antibióticos involucrados en el estrés ribotóxico como la puromicina (Puro) y la cicloheximida (CHX), logran reducir los niveles de estas proteínas (en el Anexo se resumen algunas características de estos antibióticos).

Por el contrario, también se observó que otros compuestos inductores de diferentes tipos de estrés, como la hiperosmolaridad inducida con soluciones concentradas de NaCl al 0.5M, o el uso del ácido okadaico, un inhibidor de fosfatasa que aumenta la fosforilación de diversas proteínas, no tenían efecto sobre la estabilidad de las proteínas Ski y SnoN (Vázquez-Macías, *et al.* 2005).

Por otro lado, también se demostró que el efecto de la anisomicina, sobre los niveles de las proteínas Ski y SnoN, era dependiente del proteosoma, ya que al utilizar un inhibidor del mismo llamado MG132, este fue capaz de bloquear el efecto de la anisomicina sobre los niveles proteicos de SnoN (Vázquez-Macías, *et al.* 2005).

El efecto de la anisomicina sobre Ski y SnoN es independiente de MAPK y de sus efectos ribotóxicos

Para probar que el efecto inducido por la anisomicina y los otros antibióticos era dependiente o no de MAPK, se utilizaron diferentes inhibidores para cada una de las vías de p38, JNK y ERK (SB202190, SP60125 y U0126, respectivamente), determinando que la activación de vías de estrés no era necesaria para inducir los efectos de anisomicina (Vázquez-Macías, *et al.* 2005).

Así mismo, para determinar que el efecto ribotóxico que tenían los antibióticos anisomicina y puromicina no era la causa por la cuál se observaba una disminución en los niveles proteicos de Ski y SnoN, nuestro grupo desarrolló una estrategia mediante la cual se generó una línea celular resistente a las acciones ribotóxicas de la puromicina, utilizando

un vector que confería resistencia a la puromicina por contener el gen PAC, que codifica para una puromicina-N acetiltransferasa, la cual vuelve inactiva a la puromicina al acetilarla.

De forma sorprendente, el antibiótico de puromicina-acetilada es aún capaz de promover la degradación de Ski y SnoN, lo que demuestra que su acción es independiente del daño ribosomal.

La degradación de SnoN es dependiente del contexto celular

El efecto observado con el uso de los antibióticos anisomicina, cicloheximida y puromicina no es general, debido a que solo fue detectado en algunos tipos celulares como son las células HeLa (carcinoma de cérvix humano), AD293 (células embrionarias de epitelio de riñón derivadas de la línea celular HEK293), y A549 (carcinoma de pulmón humano); no así en las células L17 y Mv1Lu (células de epitelio pulmonar de visón), ni en las HepG2 (hepatocarcinoma humano).

El receptor ALK5, pero no la activación de las R-Smads, es importante para mediar la degradación de Ski y SnoN por anisomicina

Para probar que el efecto de la Ans, CHX y Puro es independiente al mecanismo utilizado por el TGF β para mediar la degradación de sus correpresores vía las R-Smads, se utilizaron diferentes inhibidores de la señal del TGF β que afectan la actividad de cinasa del receptor ALK5, con lo cual se impide que este lleve a cabo la fosforilación en el C-terminal de las R-Smads y la propagación de la señal intracelular de la vía del TGF β .

Los resultados previamente obtenidos por nuestro grupo, mostraron que ALK5 es un elemento compartido tanto por TGF β como por anisomicina, y que es necesaria su actividad de cinasa para mediar la degradación de Ski y SnoN vía proteosoma por anisomicina pero no así la activación de las R-Smads (Vázquez-Macías, *et al.* 2005; Hernández-Damián J. *et al.* datos no publicados).

En la Figura 8 se muestra un modelo que explica como podría llevarse a cabo la degradación de Ski y SnoN inducida por anisomicina y por otros compuestos como la puromicina y cicloheximida.

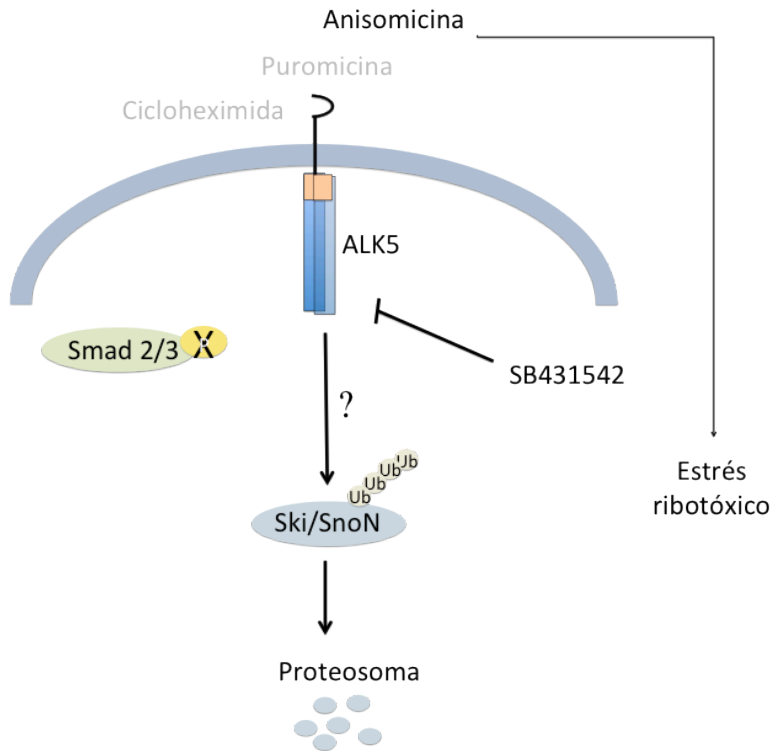


Figura 8. Mecanismo de degradación de Ski y SnoN por anisomicina. La actividad de cinasa de ALK 5 es necesaria para mediar la degradación vía proteosoma de Ski y SnoN sin requerir de la fosforilación de las R-Smads y así mismo es independiente de la activación de MAPK como p38, JNK y ERK..

JUSTIFICACIÓN

Las proteínas Ski y SnoN juegan un papel relevante en diferentes procesos fisiopatológicos; particularmente en el cáncer, pueden actuar como supresores de tumores u oncoproteínas según sus niveles proteicos. Así, la regulación de su proteína es importante para su función.

A la fecha, el TGF β es el principal regulador negativo de estas proteínas y alternativo a esta citocina, el antibiótico anisomicina también es capaz de degradar a Ski y SnoN; sin embargo, se desconoce el mecanismo por el cual la anisomicina envía a degradación a estas proteínas, por lo tanto es importante caracterizar la vía de acción de la anisomicina para regular los niveles proteicos de Ski y SnoN.

HIPÓTESIS

Si el antibiótico anisomicina emplea componentes iniciales de la cascada de señalización del TGF β ; entonces, la filamina es necesaria en el mecanismo de degradación de Ski y SnoN por anisomicina.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si la proteína FLNa está involucrada en la degradación de Ski y SnoN por anisomicina en células de melanoma.

Objetivos particulares

1. Investigar si la anisomicina induce la degradación de las proteínas Ski y SnoN en células de melanoma M2 (carentes de FLNa) y en A7 (células M2 que expresan establemente FLNa).
2. Estudiar si en células de melanoma A7 es importante la actividad catalítica del receptor ALK5 para mediar los efectos de la anisomicina en la degradación de SnoN y Ski.
3. Estudiar si el extremo carboxilo terminal de la FLNa participa en el mecanismo por el cual la anisomicina causa la degradación de las proteínas SnoN y Ski en células de melanoma M2.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo celular y reactivos

Para este trabajo, se utilizaron 2 líneas celulares humanas de Melanoma: las células M2 (carentes de Filamina a) y las células A7 (derivadas de células M2 a las que se les restituyó la expresión de Filamina A, mediante el vector LK444 (Figura 9). Ambas líneas celulares fueron mantenidas en incubación con 5% de CO₂ a 37°C en medio MEM (Minimum Essential Medium), complementado con 2% de FCS ("Fetal Calf Serum") y 8 % de FBS (Suero Fetal Bovino), más los antibióticos penicilina y estreptomicina.

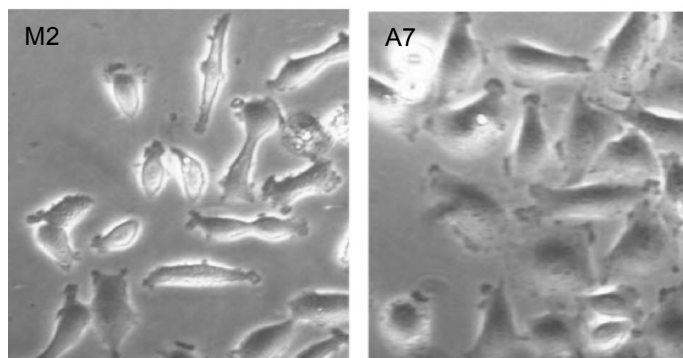


Figura 9 Contraste de fases de las células de melanoma M2 y A7

Estimulación

Para los tratamientos, las células se cultivaron en cajas Petri de 100 mm de diámetro; para el ayuno, las células se lavaron con 3 ml de medio de ayuno MEM (sin suero con antibióticos) para retirar el exceso de medio con suero y se ayunaron durante 2 hrs con 3 ml del mismo medio. Los ligandos, antibióticos y concentraciones utilizadas fueron: TGF β (0.3 nM) de Pepro Tech, anisomicina (10 μ M), puromicina (10 μ M), cicloheximida (20 mg/ml), así como el inhibidor de la actividad de cinasa de ALK5, el SB431542 (10 μ M) de Sigma.

Construcciones

El vector pcDNA3/HA-ABPC fue un obsequio del Dr. Ken Watanabe del Departamento de Investigación Geriátrica, en el Instituto Nacional de Ciencias de la Longevidad, Obu Aichi Japón.

El vector utilizado, contiene una porción trunca del carboxilo terminal de FLNa que abarca las repeticiones 20-24 (Sasaki *et al.* 2001). La construcción fue amplificada, purificada y validada mediante ensayos con enzimas de restricción. Para lo anterior, se emplearon bacterias *E-coli* de la cepa DH5 α transformadas mediante choque de calor a 42°C y sembradas en placas de agar con medio LB y ampicilina (50 μ g/ml). Las bacterias transformadas se incubaron toda la noche a 37°C a 250 rpm. Después, para su amplificación, se inoculó una colonia en medio LB líquido (300 ml) con ampicilina. El plásmido se purificó mediante el Kit de Quiagen (Maxi prep) de acuerdo a las instrucciones del fabricante y el DNA purificado se solubilizó en agua y almacenó a -20°C.

Transfecciones y generación de líneas celulares M2 estables

Se utilizaron células M2 confluentes, entre el 80-90%, resemebradas un día antes en cajas de 100 mm de diámetro. El día de la transfección se recambió el medio de las células por 4 ml de medio fresco MEM complementado con suero y antibióticos. La transfección se llevó a cabo empleando Lipofectamina, para lo cual se realizó una mezcla con 15 μ l de lipofectamina 2000 de Invitrogen más 500 μ l de OPTIMEM. Se dejó así durante 30 min a temperatura ambiente para después adicionarle una mezcla que contenía 4 μ g de DNA de los plásmidos pCMV5 y pcDNA3/HA-ABP-C en 500 μ l de medio OPTIMEM con las siguientes condiciones: 1) 4 μ g pCMV5 (vector vacío) como control negativo, 2) 0.5 μ g de pcDNA3/HA-ABP-C completada con 3.5 μ g de pCMV5 utilizado como vector de relleno, 3) 1 μ g pcDNA3/HA-ABP-C completada con 3 μ g pCMV5.

Después, se hizo una mezcla entre la lipofectamina y el DNA, dejándolos por 25 min a temperatura ambiente, y al finalizar se tomó 1 ml de cada condición y se adicionó a las células, incubándolas por 3-5 hrs a 37°C. Posteriormente, las células se complementaron con 5 ml de medio MEM suplementado con 2% de FCS (Fetal Calf Suerum) y 8 % de FBS (Fetal Bovine Suerum) más los antibióticos penicilina y estreptomycinina.

Al siguiente día, las células de cada condición se levantaron con Tripsina (0.25%) y se resembraron en 2 cajas de 60mm x 15 mm para realizar un experimento de expresión transitoria y en dos placas de 6 pozos para generar una línea estable. Ésta fue seleccionada y mantenida con el antibiótico G418 10 μ M durante 3 semanas.

Inmunoprecipitación (IP)

Las células fueron mantenidas en hielo después de la estimulación, luego se les retiró el medio de ayuno y se lavaron con 5 ml de PBS frío, cuidando de no levantar a las células. Posteriormente, se lisaron con 0.5 ml de Buffer TNTE 0.5% frío (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, y 5 mM EDTA con 0.5% Triton X-100) complementado con un coctel de inhibidores de proteasas y de fosfatasa (Apéndice). Una vez adicionado el buffer de lisis a las células, las muestras de cada tratamiento se transfirieron a tubos de 1.5 ml y se mantuvieron en rotación a 4°C por 15 min; después, se centrifugaron por 10 min a 13.2 K rpm y se descartó el pellet. Se cuantificó la proteína del sobrenadante por el método de Bradford (800 μ l H₂O desionizada + 2 μ l muestra + 200 μ l de Bradford de Bio Rad), leyéndose en un espectrofotómetro a 595nm.

Una vez cuantificadas las proteínas de las muestras, se utilizó entre 1.5 y 2 mg de extractos totales de proteína para llevar a cabo las inmunoprecipitaciones de las proteínas Ski, SnoN y Smad2/3 con anticuerpos específicos de Santa Cruz Biotechnology. Se utilizaron 1.5 μ l de anticuerpo por cada condición (ver Apéndice para más detalles). Las muestras se mantuvieron en rotación a 4°C toda la noche cuando se trataba de una primera IP y para una segunda IP se dejaban solamente 2 hrs en rotación a 4°C. Después se les agregaron 50 μ l de proteína G sefarosa, la cuál se encontraba en una dilución 1:5 con TNTE al 0.1% (Gibco) durante 2 hrs para posteriormente centrifugarlas y guardar el sobrenadante a -70°C. Se lavaron los pellets 3 veces (proteína G más proteínas inmunoprecipitadas) con 1 ml de TNTE 0.1% frío, centrifugando entre cada lavada por 10 seg a 13K rpm. Al final, se les retiró el exceso de líquido a las muestras y se les adicionaron 25 μ l de solución de Laemmli 2x. Las muestras se calentaron por 3 min a 100°C y se guardaron a -20°C hasta su separación por electroforesis.

Para el Western Blot directo, se apartaron 50 μ g de extracto de proteína total para la detección de p38, p-p38, p-ERK y ERK1/2. Las muestras fueron calentadas a 100°C por 3 min en solución de Laemmli 1x, centrifugadas por 10 seg a 13K rpm y guardadas a -20°C.

Western Blot

Las proteínas inmunoprecipitadas fueron separadas por electroforesis en un gel desnaturizante de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 7.5%, en tanto que las proteínas de

extractos totales se separaron en un gel al 10%. Al final de la corrida, las muestras fueron transferidas a una membrana de PVDF en una cámara de BioRad, a 100 V por 1 hora y 10 min, y la membrana fue bloqueada con leche descremada “Svelty” al 5% en TBST durante 1 hr. Al cabo de eso, las membranas se lavaron con TBST 1X y se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente toda la noche en agitación a 4°C. Después se incubaron con un anticuerpo secundario, anti-conejo de Zymed (1:10 000), por una hora en agitación a temperatura ambiente. Para su detección se empleó el Kit de quimioluminiscencia de Pierce-Thermo Scientific (diluido 1:5 en dH₂O) o bien el reactivo de Milipore (diluido 1:15 en dH₂O).

RESULTADOS

La filamina es importante para mediar la degradación de Ski y SnoN por anisomicina

La vía de señalización canónica del TGF β es capaz de regular a dos de sus correpresores Ski y SnoN vía las proteínas R-Smad 2 y 3. De manera alterna a esta vía, el antibiótico anisomicina también es capaz de enviar a degradación a estos correpresores independientemente de las R-Smads activadas (Vázquez Macías *et al.* 2005; Hernández-Damian *et al.* Datos no publicados).

En este trabajo se pretende determinar si la proteína FLNa está implicada o no en el mecanismo de degradación por anisomicina de Ski y SnoN utilizando un modelo de líneas celulares de melanoma: las células M2 carentes de FLNa y sus derivadas A7 que tienen reconstituida a FLNa. Por lo tanto, para probar esto, primero se caracterizaron los niveles proteicos de Ski y SnoN en las células M2 y A7, sometiendo a tratamiento ambos tipos celulares con anisomicina (10 μ M) por 45 min y TGF β como control a (0.3 nM) por 45 min y 2 horas (Figura 10 A y B).

Los resultados obtenidos muestran que los niveles proteicos de Ski y SnoN mediante ensayos de IP/WB en células M2 sorprendentemente no varían en respuesta a anisomicina ni a TGF β , lo cual concuerda con la ausencia de fosforilación de Smad2. Sin embargo, cuando se tratan a las células A7, se observa la degradación de las proteínas Ski y SnoN en respuesta a anisomicina (Figura 10 A y B). Se concluyó que la filamina es importante en el mecanismo de degradación de Ski y SnoN por anisomicina; además recupera el efecto de TGF β sobre sus correpresores al detectar la fosforilación de Smad2 y la formación de los complejos Smad2/3/Smad4.

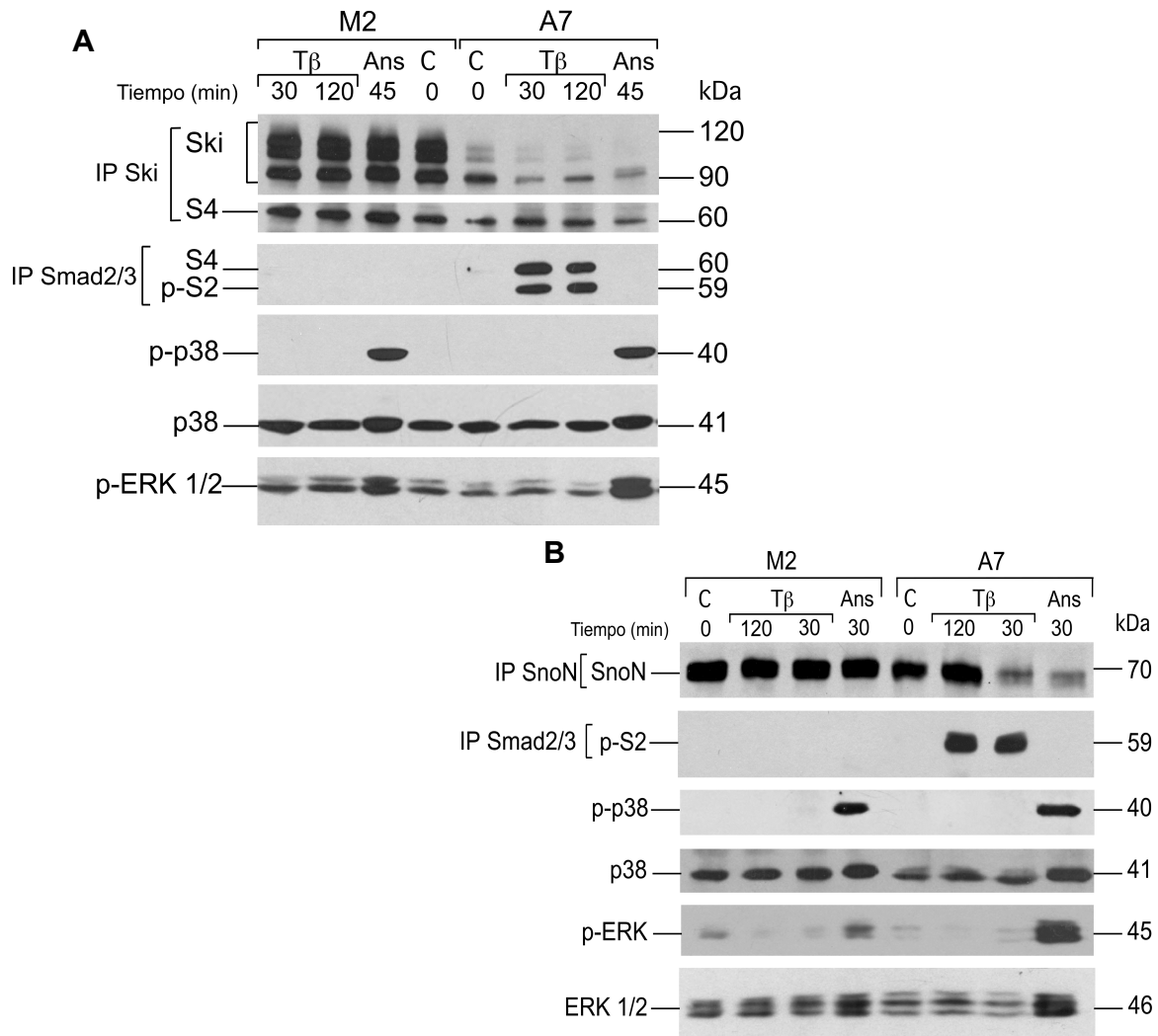


Figura 10. Las proteínas Ski y SnoN no son degradadas por efecto del TGFβ o la anisomicina en células M2. Se muestran las proteínas Ski (A) y SnoN (B) en células M2 y A7 al ser tratadas con TGFβ (0.3 nM) y anisomicina (10μM). Como control de la activación de TGFβ se muestran los blots de p-S2 (Smad2 fosforilada) y S4 (Smad4); p-p38 (p38 fosforilada) y p-ERK (ERK fosforilada) son los controles positivos del efecto de anisomicina y como controles de carga se muestran a p38 y ERK 1/2.

Los antibióticos anisomicina, puromicina y cicloheximida llevan a cabo la degradación de Ski en células A7 de melanoma

Una vez determinado que las células A7 son sensibles al efecto de anisomicina, se decidió probar si en estas células que tienen reconstituida la filamina, los niveles de la proteína SnoN cuyo gen es blanco de TGFβ exhibe una dinámica en sus niveles proteicos como en otros tipos celulares reportados por Tecalco-Cruz *et al.* 2012 y así mismo, probar otros

antibióticos con efecto similar al de la anisomicina que generan estrés ribotóxico como controles adicionales.

En esta prueba se llevo a cabo un curso temporal con TGFβ y estímulos con los antibióticos puromicina y cicloheximida en adición a la anisomicina por 45 min se determinó que en efecto.

Los resultados obtenidos muestran que los niveles de SnoN se comportan como en otros tipos celulares: disminuyen a tiempos cortos de 15 minutos y aumentan a las 2 hrs (Figura 12). Además se observó que las células A7 además de ser sensibles a anisomicina, también son sensibles a los antibióticos cicloheximida y puromicina al detectar un decremento en los niveles de Ski y SnoN (Figura 12).

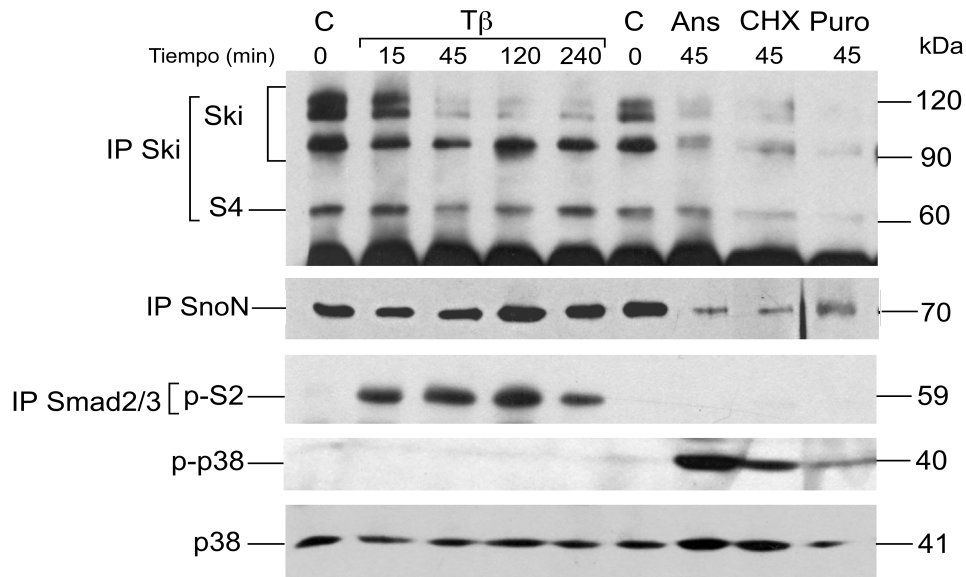


Figura 12. Ski y SnoN son degradados en las células A7 por efecto del TGFβ y los antibióticos anisomicina, cicloheximida y puromicina. Células A7 fueron tratadas a diferentes tiempos con TGFβ (0.3 nM) y con los antibióticos anisomicina (10μM), cicloheximida (100μg/ml) y puromicina (10μM) por 45 min. El TGFβ modula de manera bifásica los niveles de SnoN y no así los de Ski que tiene una recuperación muy lenta de sus niveles proteicos. Se muestra p-S2 (Smad 2 fosforilada) como control de la activación de TGFβ, p-p38 (p38 fosforilada) como control del efecto ribotóxico de los antibióticos utilizados y como control de carga se muestra p38 total.

La actividad de cinasa del receptor ALK 5 es importante para mediar el efecto de la anisomicina en células A7.

Como se ha mencionado previamente, la señalización intracelular de la citocina TGFβ es mediada por sus efectores: las proteínas Smads. Estas al ser fosforiladas por ALK5, actúan como adaptadoras para ligasas de ubiquitina; poliubiquitinan y envían a

degradación vía proteosoma a los correpresores Ski y SnoN. Para discernir si el mecanismo empleado por TGF β y anisomicina para degradar a los correpresores en células A7 también es dependiente de la actividad de cinasa de ALK5, como lo han mostrado estudios previos en otros tipos celulares (Hernández-Damián J. *et al.* datos no publicados), se realizó un pretratamiento de 30 min con el inhibidor de la actividad de cinasa del receptor ALK5, el SB431542 a una concentración de 10 μ M (Figura 13).

El resultado obtenido concuerda con otros estudios en el laboratorio que indican que el receptor tipo I de TGF β ALK5 es un elemento necesario tanto por TGF β como por anisomicina para inducir la degradación vía el proteosoma de los correpresores.

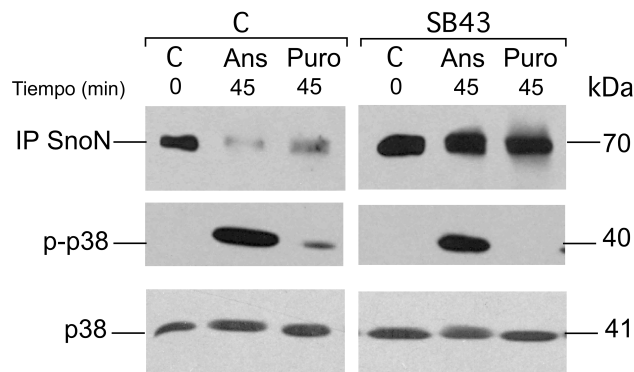


Figura 13. La actividad de cinasa de ALK 5 es importante para mediar la degradación de SnoN en células A7. Células A7 fueron pre-tratadas por 30 min con el inhibidor de ALK 5 SB431542 (10 μ M) para después estimarse con anisomicina y puromicina (10 μ M) durante 45 min. Los niveles de SnoN se muestran en el WB en una condición con o sin SB431542; adicionalmente, se muestran blots de p-p38 como control positivo del efecto ribotóxico de los compuestos y como control de carga se muestra p38 total

El Fragmento Carboxilo terminal de Filamina A no es capaz de restituir la activación de las R-Smads

Para determinar si la FLNa está involucrada en el mecanismo de degradación de Ski y SnoN llevado a cabo por TGF β o anisomicina y al mismo tiempo, conociendo que el dominio carboxilo terminal de esta proteína está implicado en la interacción con las R-Smads y facilita su activación, se transfectaron células M2 con el vector pcDNA3/HA-ABP-C, el cual contiene una secuencia que codifica para una porción trunca del carboxilo terminal de filamina correspondiente a las repeticiones 20-24.

Debido a que en experimentos transitorios no se logró recuperar la activación de la señal por TGF β utilizado como control positivo, al no detectar la fosforilación de Smad2, ni la degradación de los correpresores Ski y SnoN por esta citocina y la anisomicina, se decidió generar una línea estable seleccionada con G418 (10 μ M) para tratar de recuperar el efecto de activación del TGF β en estas células.

En la Figura 14 se muestran 2 concentraciones utilizadas del vector para evaluar la expresión de la construcción. A partir de una concentración de 0.5 μg de DNA del vector, se transfectaron las células y se generó una línea estable. Una vez obtenida la línea estable, se analizaron nuevamente los niveles de SnoN y no se encontraron cambios en los niveles de la proteína SnoN al ser tratadas las células con anisomicina (10 μM) o TGF β (0.3nM) por 45 min y tampoco se observó activación de las R-Smads cuando las células se trataron con TGF β (Figura 15).

El resultado hace considerar que para detectar a nivel endógeno la activación de TGF β , tal vez sea necesario utilizar una construcción de FLNa más larga que abarque algunos dominios, como los de unión a actina y que pudieran estar comprometiendo la función y localización de esta proteína.

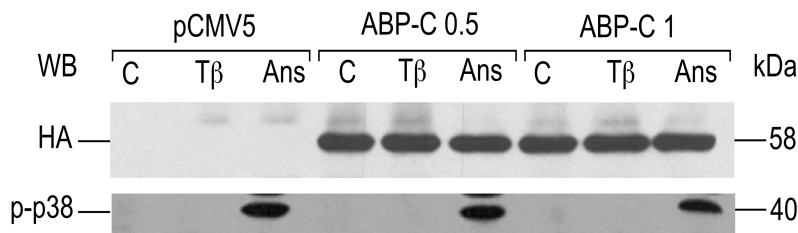


Figura 14 Expresión del vector pcDNA3/HA-ABP-C. Se muestra la detección de HA el epítipo del fragmento de filamina en este WB total para corroborar la cantidad de DNA necesaria para realizar la transfección del vector pcDNA3 HA ABP-C (0.5 μg de DNA es suficiente y necesario). Se determinó también que su estabilidad es independiente a los estímulos con TGF β (0.3nM) o anisomicina (10 μM).

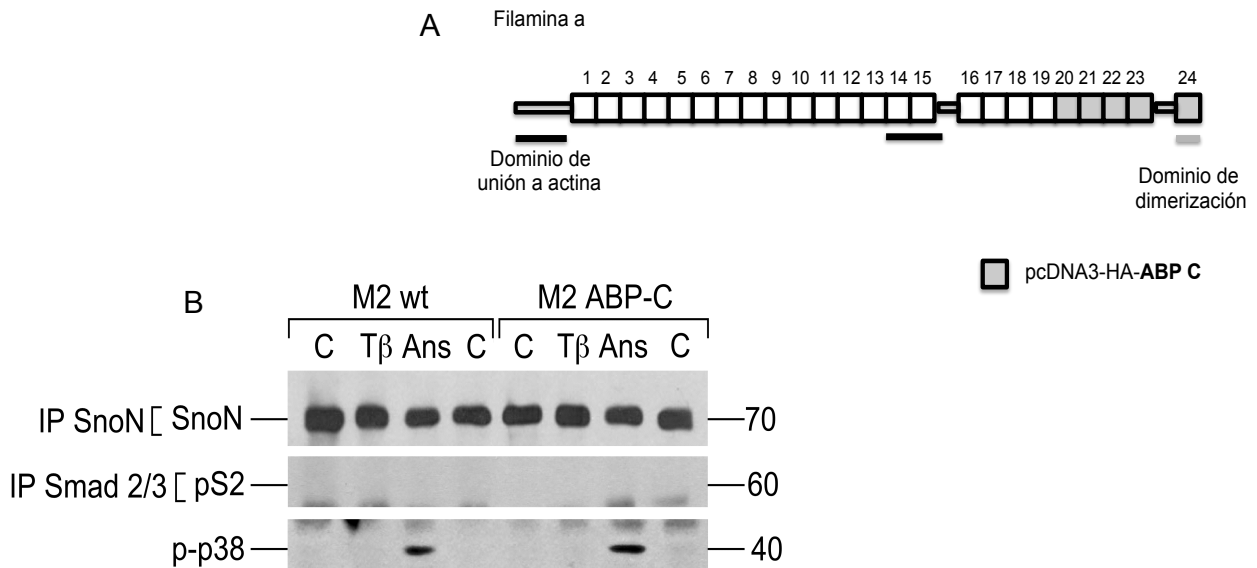


Figura 15 El fragmento C-terminal de filamina no reconstituye la señal de TGF β ni su efecto de degradación sobre SnoN. En el panel A se muestra un esquema de la proporción del fragmento ABP-C respecto a la filamina completa; en B) se muestra el WB con los niveles comparativos de SnoN en células de melanoma M2 silvestres (wt: wild

type o silvestre) contra aquellas células estables con el vector pcDNA3/HA- ABP-C. pS2 (Smad 2 fosforilada), p-p38 (p38 fosforilada).

DISCUSIÓN

El melanoma es un cáncer derivado de los melanocitos que en sus etapas iniciales correspondientes a la fase de desarrollo radial, manifiesta una respuesta favorable frente al tratamiento con cirugía y quimioterapia; sin embargo, conforme progresa la enfermedad, esta se vuelve más resistente a la quimioterapia y sus células se vuelven resistentes a los efectos inhibitorios del TGF β , sin que existan alteraciones en sus componentes de señalización hasta ahora reportados (Busse *et al.* 2011).

El TGF β tiene relevancia como blanco terapéutico en melanoma debido que como se ha comentado, es una citocina involucrada en el mantenimiento de la homeostasis celular al inhibir la proliferación celular, a través de un mecanismo que involucra la inducción transcripcional de inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas como p15 y p21, así como la represión del gen c-Myc (Massagué, 2008; Meulmeester *et al.* 2010).

La vía del TGF β es regulada negativamente a diferentes niveles por las proteínas Ski y SnoN, quienes a su vez, son regulados negativamente por los efectores de esta citocina, las R-Smads que actúan como adaptadores para las ligasas de ubiquitina E3 como Smurf2, Arkadia y APC, quienes poliubiquitinan a estas moléculas y las envían a degradación vía el proteosoma (Stroschein *et al.* 2001; Nagano *et al.* 2007).

La regulación de los niveles proteicos de Ski y SnoN son relevantes en diferentes contextos fisiológicos como la formación del sistema nervioso y la miogénesis, durante el desarrollo (Atanasoski *et al.* 2004; Berk *et al.* 1997) o la regeneración hepática, en donde los niveles de ambas proteínas están muy elevados y posiblemente antagonicen los efectos antiproliferativos del TGF β (Macías Silva *et al.* 2002; Cai *et al.* 2006). Además, se encuentran elevados en el cáncer, en donde estas proteínas exhiben una doble función debido a que pueden actuar como supresores de tumores u oncoproteínas (Shinagawa *et al.* 2000; Zhu *et al.* 2007).

Actualmente los efectos que tienen Ski y SnoN en cuanto a la progresión y relevancia en melanoma, se encuentran divididos en dos posturas, apoyadas por un lado por la Dra. Estela Medrano, quien considera que Ski tiene un papel central en la desregulación de los efectos antiproliferativos del TGF β (Reed *et al.* 1994; Reed *et al.* 2001); y por otro por lado, la postura de los doctores Alan Mauviel y Kunxin Luo quienes cuestionan el papel de estas proteínas como unos de los causantes principales en la progresión del cáncer (Jévelaud *et al.* 2011).

Nuestros datos con las células M2 indican que los efectos antiproliferativos del TGF β al menos en esta línea están bloqueados, no necesariamente por Ski o SnoN, si no por la

ausencia de la proteína FLNa; sin embargo, esto no excluye la posibilidad de que Ski o SnoN promuevan la proliferación celular en estas células cancerosas, al impedir la expresión de genes implicados en ese proceso, al estabilizar e inactivar los complejos Smad 2/4 (Suzuki *et al.* 2004); de tal manera, que para evaluar si Ski o SnoN pueden favorecer la proliferación celular en estas células, se podrían realizar ensayos *in vitro* con incorporaciones de bromodeoxiuridina el cuál es un compuesto análogo a la timidina y es incorporado al DNA durante la replicación en la fase S.

En el presente trabajo utilizando un modelo de líneas celulares de melanoma (M2 y sus derivadas A7), intentamos evaluar el papel de la proteína de andamiaje filamina A en la regulación de los correpresores Ski y SnoN por anisomicina y los datos obtenidos indican que en ausencia de filamina no es posible regular los niveles de Ski y SnoN por anisomicina ni por TGF β y aunque tratamos de recuperar la función de la filamina en las células M2 para probar que esta proteína es necesaria para mediar la degradación de Ski y SnoN, utilizando construcciones truncas de esta proteína, no logramos recuperar su función, la cual, nosotros evaluámos al intentar detectar la activación de las R-Smads por la fosforilación de Smad2 en el carboxilo terminal que es indispensable para la señalización por TGF β (Macías-Silva *et al.* 1996). Esto estaba previamente reportado por Sasaki *et al.* 2001 que se podía recuperar al transfectar células M2 con el vector pcDNA3-HA-ABPC; sin embrago, es preciso reconocer que las condiciones mediante las cuáles nosotros hemos intentado determinar la activación de las R-Smads a nivel endógeno no es la misma utilizada por Sasaki *et al.* 2001, quién empleo marcaje radioactivo, para detectar la fosforilación de Smad2 y la fosforilación que el detectó no estaba dirigida hacia algún dominio en particular de Smad2 y por lo tanto ellos pudieron recuperar una fosforilación en Smad 2 que no está implicada necesariamente en la degradación de Ski y SnoN

Indagando sobre el funcionamiento de la filamina, es posible que dada la naturaleza del vector pcDNA3/HA-ABP-C y otra construcción probada en el laboratorio de la cuál no nuestro datos llamada pEFBOS/Filamin Δ N, es que estas construcciones solo comprenden las repeticiones 20-24 y 14-24 respectivamente de la filamina A, las cuales abarcan la porción carboxilo terminal que teóricamente interacciona con las R-Smads y solo una pequeña porción de los dominios secundarios de unión a actina, por lo que es posible que la ausencia del dominio amino terminal comprometa la función y localización de la proteína (Nakamura *et al.* 2011). Por lo tanto, tal vez sea necesario utilizar construcciones más largas de FLNa para poder detectar la activación de las R-Smads a nivel endógeno y así mismo, determinar si estas células con FLNa, son sensibles como las células A7 a los efectos de los antibióticos. De confirmar esto, se podría evaluar si FLNa es capaz de interactuar con el receptor ALK5 y también estudiar su localización subcelular con estímulos de puromicina y anisomicina, para ver si existe una interacción entre Ski o SnoN con filamina y evaluar con ello, si filamina podría participar como un adaptador para alguna ligasa de ubiquitina, de las ya reportadas para mediar la degradación de Ski y SnoN.

Con respecto a otro posible mecanismo usado por la FLNa para mediar la degradación de Ski y SnoN, se ha reportado que FLNa es capaz de estabilizar al receptor FcγRI en la superficie de membrana (Beekman *et al.* 2008), y esta misma función podría estar asociada con el receptor ALK5, de tal forma que en células de melanoma M2 carentes de FLNa el receptor ALK5 podría estar deslocalizado de la membrana plasmática y esto sea la causa por la cuál no se lleva a cabo la fosforilación de las R-Smads.

En cuanto al mecanismo llevado a cabo por la anisomicina para mediar la degradación de los correpresores podría ser que como se ha mostrado en el laboratorio, este comprometida la funcionalidad del receptor ALK5, y que la FLNa sea requerida para estabilizarlo en la membrana plasmática. Sin embargo, aún no hemos detectado la ligasa de ubiquitina que podría mediar la degradación de los correpresores. Una posible propuesta apoyada por algunas observaciones de este trabajo, es que Arkadia sea la ligasa implicada; esto debido a que hemos identificado la formación de complejos Ski-Smad4 que decrecen en respuesta a los antibióticos en células A7 y Arkadia es capaz de establecer complejos con Ski/Smad4/ ALK 5 (Ferrand *et al.* 2010).

Lo que no se ha demostrado es si la formación de complejos entre Arkadia y Ski/Smad4, por efecto del TGFβ, son establecidos a pesar de que se inhiba la actividad de cinasa de ALK5. Para demostrar esto, podríamos identificar la presencia de Arkadia en células A7 y M2 analizando mediante co-inmunoprecipitaciones si se forman los complejos Arkadia-Ski-Smad4 con ALK5 y de corroborar esto, posteriormente tratar con inhibidores de ALK5 como el SB431542 para después observar si hay o no formaciones de estos complejos en respuesta a TGFβ o anisomicina y determinando si en esta formación está comprometida la actividad de cinasa de ALK5.

Sin embargo, a pesar de que Arkadia es capaz de formar heterocomplejos con ALK5 y las Smads, también puede interactuar de forma libre con Ski o SnoN (Ferrand *et al.* 2010); por lo cual, no se tiene claro cuál es el papel de ALK5 en el proceso llevado a cabo por la anisomicina para enviar a degradación a Ski y SnoN y cómo es que esta molécula es un componente compartido por este anisomicina y TGFβ.

En la Figura 16 se resume en un modelo el posible papel de la filamina en el mecanismo empleado por la anisomicina para inducir la degradación de Ski y SnoN.

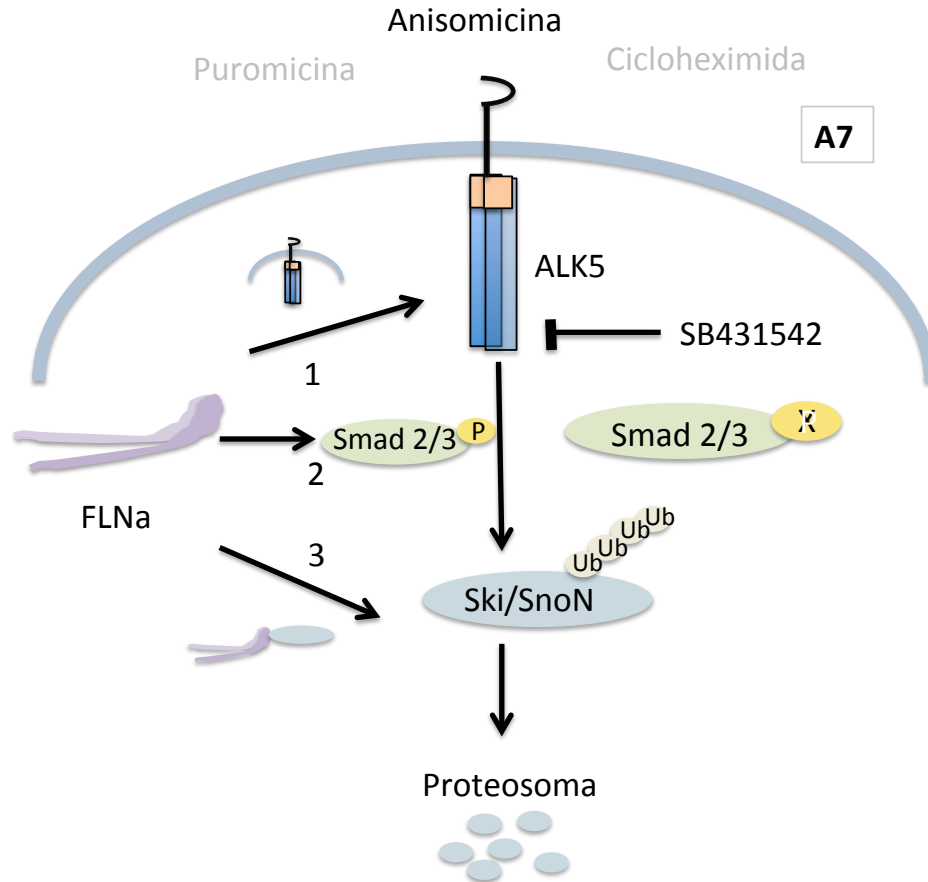


Figura 16. Modelo empleado por la anisomicina en la desregulación de Ski y SnoN. Anisomicina y otros antibióticos como la cicloheximida y puromicina, son compuestos con efectos ribotóxicos inductores de vías de estrés como p38, JNK, ERK 1/2 que de manera independiente a la activación de estas vías, requieren de la actividad catalítica de ALK 5 y filamina A en un mecanismo aún no comprendido pero que puede ser por que (1) filamina estabiliza al receptor en la membrana (2) favorece la fosforilación de las smads o interactúa directamente con Ski y SnoN, para mediar su degradación como lo muestran las células A7 y no así su línea parental M2 que carece de FLNa.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo, se ha mostrado que la FLNa es un componente más, implicado en la señalización de degradación de los correpresores Ski y SnoN por anisomicina y TGF β . Debido a que en ausencia de filamina no es posible regular los niveles de Ski y SnoN por anisomicina y cuando se reconstituye la expresión del gen de esta proteína como en las células de melanoma A7, entonces se pueden regular negativamente los niveles de Ski y SnoN por anisomicina y otros antibióticos como la puromicina y la cicloheximida.

Así mismo, se observó que para llevar a cabo la degradación de Ski y SnoN, adicional a la filamina también es requerida la actividad de cinasa del receptor ALK5.

Aún el mecanismo empleado por la anisomicina es desconocido, y en el caso de las células carentes de filamina como las células M2, podría relacionarse con la estabilidad de ALK5 en la membrana plasmática por FLNa, debido a que las células M2 que carecen de la expresión de FLNa no responden al efecto de TGF β , ni del antibiótico anisomicina.

El continuar investigando el mecanismo mediante el cual, antibióticos como la anisomicina, puromicina y cicloheximida median la degradación de Ski y SnoN y así mismo, sintetizar análogos que puedan degradar a estas proteínas sin que exhiban efectos ribotóxicos, sería importante para el desarrollo de herramientas moleculares útiles, en los estudios de la transducción de señales, que permitan modular los niveles de estas proteínas, en contextos celulares normales y patológicos para una mejor comprensión del funcionamiento de estas proteínas.

REFERENCIAS

Albino A. P., Davis B. M., Nanus D. M. (1991) Induction of growth factor RNA expression in human malignant melanoma: markers of transformation. *Cancer Research*. 51:4815-4820.

Arja M. Band, Mia Björklund, and Marikki Laiho (2009). The Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway Regulates Transforming Growth Factor- β Signaling by Destabilizing Ski and Inducing Smad7. *Journal of Biological Chemistry*. 284(51): 35441–35449.

Atanasoski S., Notterpek L., Lee HY., Castagner F., Young P., Ehrengruber M.U., Meijer D., Sommer L., Stavnezer E., Colmenares C., Suter U. (2004) The Protooncogene Ski Controls Schwann Cell Proliferation and Myelination. *Neuron*. 43:499–511.

Barrallo Gimeno Alejandro and Nieto M. Angela (2005) The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development*. 132 (14): 3155-3161

Beekman Jeffrey M., Van der Poel Cees E., Van der Linden Joke A., Van den Berg Debbie L. C., Van den Berghe Peter V. E., Van de Winkel Jan G. J., y Leusen Jeanette H. W. (2008) Filamin A Stabilizes Fc γ RI Surface Expression and Prevents Its Lysosomal Routing. *Journal of Immunology*. 180:3938-3945.

Benckert C, Jonas S, Cramer T, Von Marschall Z, Schäfer G, Peters M, Wagner K, Radke C, Wiedenmann B, Neuhaus P, Höcker M, Rosewicz S. (2003). Transforming growth factor

beta 1 stimulates vascular endothelial growth factor gene transcription in human cholangiocellular carcinoma cells. *Cancer Research*. 1:63(5):1083-92.

Berk M., Desai S.Y., Heyman H.C., Colmenares C. (1997) Mice lacking the ski proto-oncogene have defects in neurulation, craniofacial, patterning, and skeletal muscle development. *Genes Development*. 11:2029–2039

Boeck M., Ten Dijke P. (2012) Key role for ubiquitin protein modification in TGF β signal transduction. *Upsala Journal of Medical Sciences*. 117: 153–165.

Bonni S., Wang H.R., Causing C.G., Kavsak P., Stroschein S.L., Luo K., Wrana J.L. (2001) TGF-beta induces assembly of a Smad2–Smurf2 ubiquitin ligase complex that targets SnoN for degradation. *Nature Cell Biology*. 3: 587–595 .

Bonnon C. and Atanasoski S. (2012) c-Ski in health and disease. *Cell Tissue Research*. 347:51–64 .

Busse A., Keilholz U. (2011) Role of TGF β in Melanoma. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 12: 1-12.

Coux, O., Tanaka K., and Goldberg, A.L. (1996). Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annual Review Biochemistry*. 65: 801–847.

Cai Y., Shen X.Z., Zhou C.H., Wang J.Y. (2006) Abnormal expression of Smurf2 during the process of rat liver fibrosis. *Chinese Journal of Digestive diseases*. 7:237-245.

Clark W.H., Bernardino E.A. (1969) The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Research*. 29: 705-726.

Champion R.H., Burton J.L., Ebling J.G. (1994) Malignant melanoma. En Rook, Wilkinson, Ebling *Textbook of Dermatology* 5th ed, Oxford: Blackwell Scientific Publications. 1545-59.

Deheuninck J., and Kunxin L. (2009) Ski and SnoN, potent negative regulators of TGF β signaling. *Cell Research*. 19: 47–57.

Domínguez H. E. y Macías S.M. (2010) SKIL: Un inhibidor de la vía de la citocina TGF β . *REB* 29: 53-59

Dubois C. M., Blanchette F., Laprise M. H., Leduc R., Grondin F. and Nabil G. S. (2001) Evidence that Furin Is an Authentic Transforming Growth Factor β Converting Enzyme. *American Journal of Pathology*. 158:305-316

Dupont S., Inui M., Newfeld S. J. (2012) Regulation of TGF- β signal transduction by mono- and deubiquitylation of Smads. *FEBS Letters*. 586:1913–1920

Eichhorn PJ, Rodón L, González J.A., Dirac A., Gili M., Martínez S. E., Aura C, Barba I, Cuartas I., Jimenez J., García D. D., Sahuquillo J, Bernards R, Baselga J, Seoane J. (2012) USP15 stabilizes TGF- β receptor I and promotes oncogenesis through the activation of TGF- β signaling in glioblastoma. *Nature Medicine*. 19;18(3):429-35.

Feng Y. and Walsh C. A. (2004) The many faces of filamin: A versatile molecular scaffold for cell motility and signalling. *Nature Cell Biology* 6:11.

Feinberg A.P., Ohlsson R. and Steven H. (2006) The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nature Genetics*. 7: 21-33

Ferrand N., Atfi A. and Prunier C. (2010) The Oncoprotein c-Ski Functions as a Direct Antagonist of the Transforming Growth Factor- β Type I Receptor. *Cancer Research*. 70:8457-8466.

Gentry L., T. Marion; Liubin A., Purchio F. (1988) Molecular Events in the Processing of Recombinant Type 1 Pre-Pro-Transforming Growth Factor Beta to the Mature Polypeptide. *Molecular And Cellular Biology*. 4162-4168.

Hartwig, J. H. And Stossel, T. P. Isolation and properties of actin, myosin, and a new actin binding protein in rabbit alveolar macrophages. *Journal of Biological Chemistry*. 250:5696–5705 (1975).

Heldin C., Vanlandewijck M., Aristidis M. (2012) Regulation of EMT by TGF β in cancer. *FEBS Letters*. 586: 1959–1970

Hendrix, M.J. (2006). Embryonic and tumorigenic pathways converge via Nodal signaling: role in melanoma aggressiveness. *Nature Medicine*. 12, 925–932.

Javelaud D., Alexaki V. and Mauviel A. (2008) Transforming growth factor- β in cutaneous melanoma. *Pigment Cell Melanoma Research*. 21:123–132

Javelaud D., Kempen L., Alexaki V., Le S.E., Kunxin L., Mauviel A. (2011) Efficient TGF- β /SMAD signaling in human melanoma cells associated with high c-SKI/SnoN expression. *Molecular Cancer*. 10:2

Kavsak, P., Rasmussen, R.K., Causing, C.G., Bonni, S., Zhu, H., Thomsen, G.H., and Wrana, J.L (2000). Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF- β receptor for degradation. *Molecular Cell* 6: 1365–1375.

Kajino T., Emily O., Shunsuke I., Kunihiro M., Jun N.T. (2007) TAK1 MAPKKK mediates TGF- β signaling by targeting SnoN oncoprotein for degradation. *Journal of Biological Chemistry*. 282: 9475–9481.

Koinuma, D., Shinozaki, M., Komuro, A., Goto, K., Saitoh, M., Hanyu, A., Ebina, M., Nukiwa, T., Miyazawa, K., Imamura, T., and Miyazono, K. (2003) Arkadia amplifies TGF- β superfamily signalling through degradation of Smad7. *The EMBO Journal*. 22, 6458 – 6470

Krakowski AR, Laboureau J, Mauviel A, Bissell MJ, Luo K. (2005) Cytoplasmic SnoN in normal tissues and nonmalignant cells antagonizes TGF- β signaling by sequestration of the Smad proteins. *Proceedings of National Academy of Sciences*. 102: 12437-42.

Levy L., Caroline S. H. (2006) Alterations in components of the TGF- β superfamily signaling pathways in human cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 17: 41–58

Macdonald M., Wan Yong., Wang Wei., Roberts E., Cheung T. H., Erickson R., Knuesel M., and Xuedong Liu. (2004) Control of cell cycle-dependent degradation of c-Ski proto-oncoprotein by Cdc34. *Oncogene* 23:5643–5653.

Macias S.M., Abdollah S., Hoodless P.A., Pirone R., Attisano, L., and Wrana, J.L. (1996). MADR2 is a substrate of the TGF- β receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signalling. *Cell*. 87:1215–1224.

Macias-Silva M., Li W., Leu JI., Crissey MA., Taub R. (2002) Up-Regulated Transcriptional Repressors SnoN and Ski Bind Smad Proteins to Antagonize Transforming Growth Factor- β Signals during Liver Regeneration. *Journal of Biological Chemistry* 277:28483-28490.

Massagué J. (1998) TGF- β Signal Transduction. *Annual Review Biochem*. 1998. 67:753–91.

Meulmeester E. and Ten D. P. (2010) The dynamic roles of TGF β in cancer. *Journal of Pathology*. 223: 205–218.

Miyazono K. and Daizo K. (2010) Arkadia: beyond the TGF β pathway; *Journal of Biochemistry*. 149:1–3.

Nagano Y., Mavrakis K.J., Kian L.L., Fujii T., Koinuma D., Sase H., Yuki K., Isogaya K., Saitoh M., Imamura T., Episkopou V., Miyazono K. and Miyazawa K. (2007) Arkadia Induces Degradation of SnoN and c-Ski to Enhance Transforming Growth Factor- β Signaling. *The Journal of Biological Chemistry*. 282: 20492–20501.

Nakamura F., Stossel T. P. and Hartwig J.H. (2011) The filamins: Organizers of cell structure and function. *Cell adhesion & migration*. 5: 160-169.

Pardali K., Moustakas A. (2007) Actions of TGF- β as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1775: 21–62.

Park S.H. (2005) Fine Tuning and Cross-talking of TGF- β Signal by Inhibitory Smads. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 38: 9-16

Peters, J.M. 1999. Subunits and substrates of the anaphase promoting complex. *Experimental Cell Research*. 248: 339–349.

Postovit L.M., Margaryan N.V., Seftor E.A. y Hendrix M. (2008) Role of nodal signaling and the microenvironment underlying melanoma plasticity. *Pigment Cell & Melanoma Research*. 21; 348–357

Postovit, L.M., Seftor, E.A., Seftor, R.E., and Hendrix, M.J. (2007). Targeting Nodal in malignant melanoma cells. *Expert Opinion on Therapeutics Targets*. 11, 497–505.

Reed, J.A., McNutt, N.S., Prieto, V.G., and Albino, A.P. (1994). Expression of transforming growth factor-beta 2 in malignant melanoma correlates with the depth of tumor invasion, Implications for tumor progression. *The American Journal of Pathology*. 145:97–104.

Reed, J.A., Bales, E., Xu, W., Okan, N.A., Bandyopadhyay, D., and Medrano, E.E. (2001). Cytoplasmic localization of the oncogenic protein ski in human cutaneous melanomas in vivo: functional implications for transforming growth factor Beta signaling. *Cancer Research*. 61, 8074–8078.

Roger et al. (2001). Epidermal growth factor signaling via ras controls the smads transcriptional corepressor TGIF. *The EMBO Journal*. 20: 128-136

Sasaki A., Masuda Y., Ohta Y., Ikeda K., and Watanabe K. (2001). Filamin Associates with Smads and Regulates Transforming Growth Factor-b Signaling. *The Journal of Biological chemistry*. 276: 17871–17877.

Shinagawa, T., H.-D. Dong, M. Xu, T. Maekawa, and S. Ishii. (2000). The son gene, which encodes a component of the histone deacetylation complex, acts as a tumor suppressor in mice. *The EMBO Journal*. 19:2280–2291.

Stroschein S. L., Bonni S., Wrana J.L. and Kunxin L. (2001) Smad3 recruits the anaphase-promoting complex for ubiquitination and degradation of SnoN. *Genes and Development*. 15:2822–2836

Sigalotti L., Covre A., Fratta E., Parisi G., Colizzi F., Rizzo A., Danielli R., Hugues J.M. Coral S. and Maio M. (2010) Epigenetics of human cutaneous melanoma: setting the stage for new therapeutic strategies. *Journal of Translational Medicine*. 8:56.

Sosa G.M; Macías S.M. (2004) El factor de crecimiento Transformante Beta: Funciones y vías de transducción. *REB* 23: 3-11

Suzuki H., Yagi K., Kondo M., Kato M., Miyazono K., Miyazawa K. (2004) c-Ski inhibits the TGF-beta signaling pathway through stabilization of inactive Smad complexes on Smad-binding elements. *Oncogene*. 23:5068-5076.

Tecalco C.A., Sosa G.M, Vázquez V. G., Ortiz G. L., Domínguez H.E., and Macías S. M. (2012) Transforming Growth Factor- β /SMAD Target Gene *SKIL* Is Negatively Regulated by the Transcriptional Cofactor Complex SNON-SMAD4. *The Journal of Biological Chemistry*. 287: 26764–26776

Ten Dijke P. and Caroline S. H. (2004) New insights into TGF- β –Smad signalling. *Trends in Biochemical Sciences*. 29:265-73.

Topczewska, J.M., Postovit, L.M., Margaryan, N.V., Sam, A., Hess, A.R., Wheaton, W.W., Nickoloff, B.J., Topczewski, J., and Hendrix, M.J. (2006). Embryonic and tumorigenic pathways converge via Nodal signaling: role in melanoma aggressiveness. *Nature Medicine*. 12:925–932.

Vázquez M. A., Ruíz M.A., Fonseca S.M., Briones O.M., Macías S.M. (2005) Downregulation of Ski and SnoN co-repressors by anisomycin. *FEBS Letters*. 579: 3701–3706.

Vinod S.S., Marathe H. e De la Serna I. L. (2010) Switching on the transcriptional circuitry in melanoma. *Epigenetics*. 5:6, 469-475.

Wang, K., Ash, J. F. and Singer, Stossel J. (1975). Filamin, a new high-molecular-weight protein found in smooth muscle and non-muscle cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 72: 4483–4486.

Weihing R. R. (1988) Actin-binding and dimerization domains of HeLa cell filamin. *Biochemistry*. 27: 1865-1869.

Wrighton K.H., Liang M., Bryan B., Luo K., Liu M., Feng X.H., Lin X. (2007) Transforming growth factor-beta-independent regulation of myogenesis by SnoN sumoylation. *The Journal of Biological Chemistry*. 282(9):6517-24.

Xia Lin., Min L., and Xin H. F. (2000) Smurf2 Is a Ubiquitin E3 Ligase Mediating Proteasome-dependent Degradation of Smad2 in Transforming Growth Factor- β Signaling.

The Journal of Biological Chemistry. 275:36818–36822.

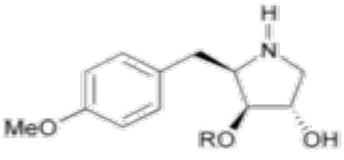
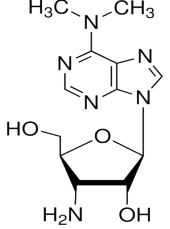
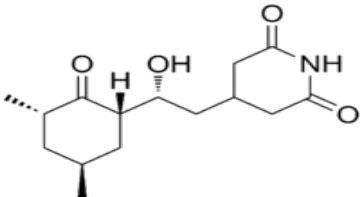
Xiaohua Y., Ye G.C. (2011) Smad7: not only a regulator, but also a cross-talk mediator of TGF- β signalling. The Biochemical Journal. 434:1-10.

Zhu Q., Krakowski A.R., Dunham E.E., Wang L., Bandyopadhyay A., Berdeaux R., Martin Steven, Sun L.Z., and Kunxin L.. (2007) Dual Role of SnoN in Mammalian Tumorigenesis. Molecular and Cellular Biology. 27:324–339.

Zhou A.X., Hartwig J.H. and Akyürek L. M. (2009) Filamins in cell signaling, transcription and organ development. Trends in Cell Biology. 20:113-123.

Anexo

1. Características de los inhibidores de la síntesis de proteínas utilizados

Compuesto	Anisomicina	Puromicina	Cicloheximida
Tipo de compuesto	Pirrólico heterocíclico	Aminonucleósido	Piperidona heterocíclica
Modo de acción	Inhibidor competitivo de la peptidil transferasa por su unión a la subunidad 60S ribosomal	Inhibidor competitivo de la aminoacil t-RNA, bloqueando su unión al sitio A ribosomal	Inhíbe la elongación de la cadena polipeptídica por su unión al sitio E de la subunidad 60S
Sustrato	Ribosoma eucarionte	Ribosoma eucarionte y procarionte	Ribosoma eucarionte
Origen	<i>Streptomyces griseolus</i>	<i>Streptomyces alboniger</i>	<i>Streptomyces griseus</i>
Imagen			
Concentración Stock	10 mM	10 µg/µl	20 mg/ml
Concentración utilizada	10 µM	10 µg/ml	100 µg/ml
Disolvente	DMSO	H ₂ O	H ₂ O
Inhibición de Síntesis de proteínas	+	+	+
ERK	+	+	+
p38/SAPK2	+	+	+
JNK/SAPK	+	+	+

2. Lista de Anticuerpos utilizados

Anticuerpos primarios

Anticuerpo	Tipo	Concentración	Uso		Cantidad/Dilución utilizada		Almacenaje	Compañía
			IP	WB	IP	WB		
SnoN-H317	Rabbit Polyclonal IgG	200 µg/ml	*	*	1.5 µl	1:1000	4°C	Santa Cruz Biotechnology
Ski H329	Rabbit Polyclonal IgG	200 µg/ml	*	*	1.5 µl	1:1000	4°C	Santa Cruz Biotechnology
Smad2/3 N-19	Goat polyclonal IgG	200 µg/ml	*		1.5 µl		4°C	Santa Cruz Biotechnology
p-Smad2	Rabbit Polyclonal IgG	-		*		1:1000	-20°C	Milipore
p-p38 Thr180/Tyr182	Rabbit Polyclonal IgG	-		*		1:1000	-20°C	Cell Signaling
p-38 total	Rabbit Polyclonal IgG	-		*		1:1000	-20°C	Cell Signaling
αERK	Rabbit polyclonal IgG	-		*		1:1000	4°C	Cell Signaling
p44/42 MAPK (Erk1/2)	Rabbit polyclonal IgG	-		*		1:1000	-20°C	Cell Signaling

Anticuerpos secundarios

Anticuerpo	Dilución	Almacenaje	Compañía	Catálogo	Lote
HRP-Goat anti rabbit IgG	1:20000	4°C	Invitrogen	62-6120	406412A

3. Soluciones empleadas

I. Medio de cultivo (1L)

a) Preparación del medio

1 sobre Minimum Essential Medium (Gibco)
1.5 g NaHCO_3
1L dH_2O (* d es desionizada)
pH 7.4

Una vez preparado el medio se esteriliza por filtración y es complementado con suero o antibióticos

b) Complemento de medio

8% FBS (Fetal Bovine Suerum)
2% CFS (Calf Fetal Suerum)

*Para medio de Ayuno el medio no se complementa con FBS ni CFS y sólo se le adicionan los antibióticos de penicilina estreptomycinina.

c) Antibióticos

1ml de Antibióticos Penicilina/Estreptomycinina (Gibco) por cada 100 ml de Medio

5,000 unidades Penicilina
5,000 $\mu\text{g/ml}$ Estreptomycinina

II. Soluciones para lisis celular

a) PBS 10X (1L)

134 mM NaCl
2.7 mM KCl
4.3 μM Na_2HPO_4
1.4 μM KH_2PO_4

b) TN 10x (100 ml)

50 ml Tris 1M
30 ml NaCl 5M
20 ml H₂O

c) Buffer de lisis TNTE 0.5%

10 ml TN 10x
0.2 ml EDTA 0.5M (pH 8)
5 ml Tritón 10%
85 ml dH₂O

- Este Buffer debe ser complementado con los inhibidores de proteasas y fosfatasa

d) Tabla de Inhibidores de proteasas y fosfatasa

Inhibidores de Fosfatasa (4°C)			
Inhibidor	Solución en que se encuentran preparados	Concentración	µl/ml Buffer Lisis
NaF	H ₂ O	40x	25
NaPPi	H ₂ O y Hcl 8mM	100x	10
NaVO ₄	H ₂ O	100x	10
Inhibidores de proteasas (4°C)			
PMSF	Isopropanol	200x	5
Inhibidor de Tripsina	TE, pH 7.4	500x	2
Pepstatina	DMSO	500x	2
Leupeptina	TE	500x	2
Antipaina	TE	500x	2
Benzamida	TE	500x	2
β-Glicerofosfato	TE	500x	2

III. Soluciones para inmunoprecipitación de proteínas

a) Buffer TNTE 0.1 % (100 ml)

10 ml TN 10x
0.2 ml EDTA 0.5 M

1 ml Triton 10%
88.8 ml dH₂O

b) Preparación de proteína G

Tomar del Stock 2 ml de proteína G-Sefarosa y lavarla con TNTE 0.1 % tres veces para retirar el exceso de etanol, centrifugando a 13 krpm en cada lavado y descartando el sobrenadante, al final resuspender la proteína G 1:5 con TNTE 0.1% y guardar a 4°C

IV. Preparación de geles de poliacrilamida

a) Acrilamida/Bis-metil Acrilamida (30%/0.8 %)

87.6 g Acrilamida
2.4 g Bis-metil-Acrilamida
Aforar hasta 300 ml dH₂O

b) 1.5 M Tris-Hcl, pH 8.8

18.15 g Tris base
100 ml dH₂O

c) 0.5 M Tris-Hcl pH 6.8

6 g Tris base
100 ml dH₂O

V. Soluciones para electroforesis de proteínas

a) Buffer de corrida 10x, pH 8.3 (1L)

30.2 g Tris base
144 g Glicina
100 ml SDS
Hasta aforar a 1L dH₂O

VI. Soluciones para transferencia de proteína

a) Buffer de transferencia 10X

30.3 g Tris base
144.15 g Glicina
Aforar a 1L con dH₂O

c) Buffer de transferencia 1X (1L)

100 ml Buffer de transferencia 10X
200 ml Metanol Absoluto
700 ml dH₂O

d) TBS 10X, pH 8.1-8.5

30.3 g Tris
base
144.5 g Glicina
Aforar a dH₂O
1L

e) TBS 1X

100 ml TBS 10X
1 ml Tween 20
900 ml dH₂O